



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA – UNEB
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS – PPGFARMA

SAUL VISLEI SIMÕES DA SILVA

**DESENHO ESTRUTURAL, SÍNTESE E ATIVIDADES ATIOXIDANTE,
ANTIMICROBIANA, ANTILEISHMANIA, ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTICÂNCER DE UM NOVO DERIVADO ACETILADO DA
QUERCETINA**

Salvador

2021

SAUL VISLEI SIMÕES DA SILVA

**DESENHO ESTRUTURAL, SÍNTESE E ATIVIDADES ATIOXIDANTE,
ANTIMICROBIANA, ANTILEISHMANIA, ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTICÂNCER DE UM NOVO DERIVADO ACETILADO DA
QUERCETINA**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação *Stricto Sensu* Em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Aníbal de Freitas Santos Júnior

Co-Orientador: Prof. Dr. Lourenço Luís Botelho de Santana

Linha de Pesquisa: I – (Prospecção de Fármacos e Recursos Naturais)

Salvador

2021

FICHA CATALOGRÁFICA
Sistema de Bibliotecas da UNEB

S586d

Silva, Saul Vislei Simões da

Desenho estrutural, síntese e atividades antioxidante, antimicrobiana, antileishmania, anti-inflamatória e anticâncer de um novo derivado acetilado da quercetina / Saul Vislei Simões da Silva. - Salvador, 2021.

122 fls.

Orientador(a): Prof. Dr. Aníbal de Freitas Santos Júnior.

Coorientador(a): Prof. Dr. Lourenço Luís Botelho Santana.

Inclui Referências

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGFARMA, Campus I. 2021.

1. Química orgânica. 2. Química - flavanóides - quercetina.
3. Farmacologia.

CDD: 615

FOLHA DE APROVAÇÃO

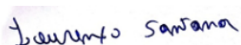
"DESENHO ESTRUTURAL, SÍNTESE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS (ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA, ANTILEISHMANIA, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTICÂNCER) DE UM NOVO DERIVADO ACETILADO DO BIOFLAVONÓIDE QUERCETINA"

SAUL VISLEI SIMÕES DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 29 de outubro de 2021, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:



Professor Dr. ANÍBAL DE FREITAS SANTOS JÚNIOR
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Química
Universidade Federal da Bahia



Professor Dr. LOURENÇO LUIS BOTELHO DE SANTANA
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Química
Universidade Federal da Bahia



Professor Dr. CASSIO SANTANA MEIRA
Centro Universitário Maurício de Nassau - UNINASSAU
Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz



Professora Dr^a SILVIA LIMA COSTA
Universidade Federal da Bahia - UFBA
Doutorado em Neurociências
Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne

*Aos meus familiares e amigos que me
apoiaram nessa jornada, e em especial
à minha companheira*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a toda rede de colaboração que ajudaram a tornar esse trabalho possível. Primeiramente, ao meu orientador e idealizador desse trabalho, o professor Aníbal Júnior, ao qual eu tive a sorte de conhecer e de receber orientações tão precisas, transmitidas com tamanha paciência e serenidade. Agradeço também ao meu Co-orientador, Prof. Lourenço Santana, pela disposição, pelos materiais e pelas aulas. Também, foi um grande prazer aprender com o prof. Lourenço.

Agradeço grandemente ao Prof. Cássio Meira pelos seus comentários e ajustes sempre precisos e, ao Prof. Victor Diógenes Silva e à Profa. Elisalva Guimarães pela solidariedade e pelos apontamentos levantados no exame de qualificação, que foram de grande valia. À profa. Silvia Lima e a Profa. Lourdes Neta, pelo suporte e pela colaboração.

Em especial agradeço aos estudantes e colegas Cleonice, Orlando, Luciano, Tatiana, Rebeca e Thaís pelo compromisso com a ciência e força, que ajudaram a fazer esse trabalho acontecer.

**“Só existe um contaminante que se espalha mais rápido do que um vírus...
O medo!”**

Dan Brown

RESUMO

SILVA, S. V. S. Obtenção do análogo estrutural quercetina pentaacetato e suas aplicações em culturas celulares (Dissertação). Salvador: Departamento de Ciências da Vida (DCV), Universidade do Estado da Bahia, 2021; 101p.

A quercetina é um flavonóide com ação antioxidante e desperta interesse como agente biológico, em especial como potencial agente anticâncer. A baixa solubilidade em água, o extenso metabolismo enzimático e a reduzida biodisponibilidade limitam o emprego biofarmacológico dessa molécula. Esse trabalho objetivou realizar uma modificação estrutural na molécula da quercetina (Q) para a obtenção do análogo quercetina pentaacetato (Q5), visando investigar a sua atividade antioxidante e potencialidades biológicas, em culturas celulares. A rota sintética orgânica consistiu na reação da quercetina (300 mg) com anidrido acético (0,80 mL) e piridina (7,5 mL). O composto obtido foi caracterizado por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e por Ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C). Os sinais dos espectros obtidos evidenciaram a reação de acetilação total. Avaliou-se o potencial antioxidante de Q e Q5 frente ao radical [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] – ABTS $^{+}$. Em seguida, foi avaliado o potencial antibacteriano dos compostos (Q e Q5) pelo método de microdiluição em caldo, e a concentração inibitória mínima (MIC), foi determinada frente às cepas das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* e o efeito fungicida frente à cepa de *Cândida albicans*. A atividade antileishmania foi realizada pelo teste de citotoxicidade, em culturas axênicas de promastigotas das espécies de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*. Posteriormente, foi avaliado o potencial anti-inflamatório dos compostos (Q e Q5) através da dosagem da citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral (TNF) e da produção de óxido nítrico (NO), em sobrenadante de macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos da linhagem BALB/c, ativados com Lipopolissacarídeo (LPS) e interferon gama (INF- γ). Em adição, foram realizados testes de citotoxicidade pelo método do AlamarBlue, em células cancerígenas da linhagem HepG2 (hepatocarcinoma humano), HL-60 (leucemia promielocítica) e MCR-5 (fibroblastos saudáveis de pulmão humano), e o teste de citotoxicidade do 3-(4,5- di metil tiazol -2-il) -2,5-di fenil brometo de tetrazólio (MTT), para avaliar o potencial anticancerígeno frente a culturas de células C6 (glioma de ratos). Os resultados mostraram que a quercetina foi pouco reativa, nas tentativas de rotas sintéticas reacionais realizadas, entretanto Q5 foi obtido com um rendimento de 54%. Os espectros FTIR e RMN confirmaram as substituições das hidroxilas da molécula da quercetina por grupos acetato, formando o composto Q5. Na análise da atividade de sequestro de radicais livres (ROS) pelo radical ABTS $^{+}$, Q5 apresentou atividade inferior (18%, $\text{CI}_{50} = 379,560 \pm 0,004 \mu\text{M}$), quando comparado com Q (29% $\text{CI}_{50} = 188,850 \pm 0,003 \mu\text{M}$), o que se justifica pela substituição das hidroxilas na reação de acetilação. Os compostos (Q e Q5) não demonstraram atividade antimicrobiana ($\text{MIC} > 100 \mu\text{g mL}^{-1}$). A quercetina não apresentou atividade antileishmania ($\text{CI}_{50} > 100 \mu\text{M}$) para as espécies testadas. Para a *L. braziliensis*, o derivado Q5 não demonstrou atividade ($\text{CI}_{50} > 100 \mu\text{M}$), porém, para *L. amazonensis*, o análogo exibiu menor valor de CI_{50} ($75,1 \pm 4,7 \mu\text{M}$). Na atividade anti-inflamatória, os tratamentos com os compostos (Q e Q5) mostraram redução, de forma concentração dependente, sobre a produção de NO e de TNF ($p < 0,05$). Interessantemente, observou-se uma atividade superior das duas moléculas testadas em concentrações acima de $40 \mu\text{M}$, quando comparadas com o fármaco padrão, a dexametasona ($20 \mu\text{M}$). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os compostos testados. A atividade anticancerígena para a linhagem HepG2 demonstrou valores de $\text{CI}_{50} > 80 \mu\text{M}$ para a quercetina e CI_{50} de $53,86 \mu\text{M}$ para o análogo obtido. Para a linhagem HL-60, Q5 apresentou valor de CI_{50} superior ao da quercetina (33,55 e 51,26, respectivamente), demonstrando seletividade da molécula sintetizada na indução de morte em células cancerígenas, quando comparada a linhagem de células saudáveis MRC-5 ($\text{IC}_{50} > 80 \mu\text{M}$). Finalmente, a partir do MTT realizado em células C6, evidenciou uma superioridade citotóxica de Q5 ($\text{CI}_{50} = 11 \mu\text{M}$) quando comparado com a quercetina ($\text{CI}_{50} > 50 \mu\text{M}$), além da promoção de modificações morfológicas celulares para perfis arredondados, ainda não observados na literatura. Conclui-se que o análogo quercetina pentaacetato apresentou efeitos biológicos potenciais, quando comparado com o bioflavonóide quercetina, podendo ser promissor para futuras investigações mais aprofundadas frente a outras culturas celulares, em especial as neurais.

Palavras-chave: Flavonóides; Quercetina; Síntese orgânica; Quercetina pentaacetato; Atividades biológicas; Culturas de células

ABSTRACT

SILVA, S. V. S. Obtaining the structural analogue quercetin pentaacetate and its applications in cell cultures (Dissertation). Salvador: Department of Life Sciences (DCV), State University of Bahia, 2021; 101p.

Quercetin is a flavonoid with antioxidant action and arise interest as a biological agent, especially as a potential anticancer agent. The low solubility in water, the extensive enzymatic metabolism and the reduced bioavailability limit the biopharmacological use of this molecule. This work aimed to carry out a structural modification in the quercetin (Q) molecule to obtain the quercetin-pentaacetate (Q5) analogue, in order to investigate its antioxidant activity and biological potential in cell cultures. The organic synthetic route consisted of reaction quercetin (300 mg) with acetic anhydride (0.80 mL) and pyridine (7.5 mL). The compound obtained was characterized by Fourier transform infrared (FTIR) and by nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C NMR). The spectral signals obtained showed the total acetylation reaction. The antioxidant potential of Q and Q5 against the radical [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin) 6-sulfonic acid] – ABTS $^{\cdot+}$ was evaluated. Then, the antibacterial potential of the compounds (Q and Q5) was evaluated by the broth microdilution method, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was provided against the strains of bacteria *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* and the fungicidal effect against *Candida albicans* strain. The antileishmania activity was performed by cytotoxicity test in axenic promastigotes cultures of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* species. Subsequently, the immunomodulatory potential of the compounds (Q and Q5) was evaluated by measuring the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF) and the production of nitric oxide (NO) in supernatant of mouse peritoneal exudate macrophages from the BALB/c lineage, activated with Lipopolysaccharide (LPS) and interferon gamma (INF- γ). In addition, cytotoxicity tests were performed using the AlamarBlue method, in cancer cells of the HepG2 (human hepatocarcinoma), HL-60 (promyelocytic leukemia) and MRC-5 (healthy human lung fibroblasts) lineage, and the cytotoxicity test of 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), to assess the anticancer potential against C6 cell cultures (rat glioma). The results showed that quercetin was little reactive in the attempts of synthetic reaction routes carried out, however Q5 was obtained with a yield of 54%. The FTIR and NMR spectra confirmed the substitution of the hydroxyls of the quercetin molecule by acetate groups, forming the compound Q5. In the analysis of free radical scavenging (ROS) activity by the ABTS $^{\cdot+}$ radical, Q5 showed lower activity (18%, $\text{IC}_{50} = 379.560 \pm 0.004 \mu\text{M}$), when compared to Q (29% $\text{IC}_{50} = 188.850 \pm 0.003 \mu\text{M}$), which is justified by replacement of hydroxyls in the acetylation reaction. The compounds (Q and Q5) did not demonstrate antimicrobial activity ($\text{MIC} > 100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Quercetin did not show antileishmanial activity ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$) for the tested species. For *L. braziliensis*, the Q5 derivative did not show activity ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$), however, for *L. amazonensis*, the analogue exhibited a lower IC_{50} value ($75.1 \pm 4.7 \mu\text{M}$). In the anti-inflammatory activity, the treatments with the compounds (Q and Q5) showed a concentration dependent reduction on the production of NO and TNF ($p < 0.05$). Interestingly, there was a higher activity of the two molecules tested at concentrations above $40 \mu\text{M}$, when compared to the standard drug, dexamethasone ($20 \mu\text{M}$). No statistical differences were observed between the compounds tested. The anticancer activity for the HepG2 showed IC_{50} values $> 80 \mu\text{M}$ for quercetin and IC_{50} of $53.86 \mu\text{M}$ for the analog obtained. For the HL-60 lineage, Q5 had an IC_{50} value higher than that of quercetin (33.55 and $51.26 \mu\text{M}$, respectively), showed selectivity of the synthesized molecule in inducing death in cancer cells, when compared to the healthy cell line MRC-5 ($\text{IC}_{50} > 80 \mu\text{M}$). Finally, from the MTT performed on C6 cells, it showed a cytotoxic superiority of Q5 ($\text{IC}_{50} = 11 \mu\text{M}$) when compared to quercetin ($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{M}$), in addition to promoting cellular morphological changes for rounded profiles, not yet observed in literature. It is concluded that the analogue quercetin penta-acetate had potential biological effects, when compared to the bioflavonoid quercetin, and may be promising for further investigations against other cell cultures, especially neural ones.

Keywords: Flavonoids; quercetin; organic synthesis; quercetin pentaacetate; biological activities; cell cultures.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-Azino-Bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ATR	Reflexão total atenuada (do inglês, <i>Attenuated total reflection</i>)
CCD	Cromatografia em camada delgada
CI ₅₀	Concentração Inibitória em 50%
D	Duplete
DA	Doença de Alzheimer
Dd	Duplo duplete
DMEM	Meio de Dulbecco modificado por Eagle (do Inglês, " <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ")
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DP	Dopamina
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazil
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
Eq	Equivalente
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>)
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IUPAC	União internacional de química pura e aplicada (do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
LPS	Lipopolissacarídeos
MBC	Concentração bactericida mínima (do inglês, <i>Minimum bactericidal concentration</i>)
MIC	Concentração mínima inibitória (do inglês, <i>(Minimum inhibitory concentration)</i>)
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NO	Oxido Nítrico (do inglês, <i>Nitric Oxide</i>)
NOS	Enzima óxido nítrico sintase (do inglês, <i>Nitric oxide synthase</i>)
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>)

Pf	Ponto de fusão
RMN	Ressonância Magnética nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>Reactive oxygen species</i>)
S	Singlete
SBF	Soro fetal bovino (do inglês, <i>Fetal bovine serum</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês, <i>tumor necrosis fator</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês, <i>World Health Organization</i>)
δ	Desvio químico
K _{máx}	Comprimento de onda para os máximos de absorvância

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 01. Esqueleto estrutural da quercetina.....	24
Figura 02. Tentativas de rotas reacionais descritas para a quercetina	58
Figura 03. Espectro de infravermelho da Quercetina padrão.....	68
Figura 04. Espectro infravermelho do produto obtido, o análogo quercetina 3, 3', 4', 5, 7 – pentaacetato (Q5)	68
Figura 05. Espectro de RMN ^1H da quercetina.....	69
Figura 06. Expansão do espectro de RMN ^1H da quercetina.....	70
Figura 07. Espectro completo de RMN ^{13}C da quercetina.....	71
Figura 08. Espectro completo RMN ^1H do composto obtido, o análogo quercetina pentaacetato (Q5)	72
Figura 09. Expansão do espectro RMN ^1H do composto obtido, o análogo quercetina pentaacetato (Q5)	73
Figura 10. Expansão da região mais alifática do espectro da RMN ^1H do análogo obtido, o análogo quercetina pentaacetato (Q5)	73
Figura 11. Espectro completo de RMN ^{13}C do produto obtido, o análogo quercetina pentaacetato (Q5)	74
Figura 12. Expansão do espectro de RMN ^{13}C do composto obtido, o análogo quercetina pentaacetato (Q5)	74
Figura 13. Expansão da região alifática do espectro de RMN ^{13}C do análogo obtido, o análogo quercetina pentaacetato (Q5)	75
Figura 14. Atividade de sequestro do radical ABTS $^{+\bullet}$ pela Quercetina e análogo obtido, o análogo quercetina pentaacetato (Q5).	76
Figura 15. Efeitos da quercetina e do seu análogo quercetina-penta acetato em macrófagos (<i>in vitro</i>)	82
Figura 16. Efeitos da quercetina e do análogo quercetina-pentaacetato na viabilidade de células HepG2.....	84
Figura 17. Análise da Atividade citotóxica pelo teste do MTT em células C6 expostas a quercetina (Q) e ao composto quercetina-pentaacetato (Q5),	86
Figura 18. Análises das mudanças morfológicas de células C6.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Classificação dos bioflavonóide e efeitos biológicos já demonstrados.....	25
Tabela 02. Atividades biológicas da quercetina já entremostradas.....	41
Tabela 03. Concentração dos controles para ensaio de atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica)	61
Tabela 04 Atividade antimicrobiana da Quercetina (Q) e do análogo quercetina pentaacetato (Q5), em $\mu\text{g mL}^{-1}$	77
Tabela 05. Atividade anti-leishmania, frente às formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania braziliensis</i> , da Quercetina (Q) e do análogo quercetina pentaacetato (Q5)	79
Tabela 06. Citotoxicidade dos compostos Quercetina (Q) e Quercetina penta-acetato (Q5) frente a linhagem de células saudáveis MRC-5 e linhagens diferentes de células cancerígenas: HepG2, HL-60 e C6	85

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 01. Efeito de sequestro do ABTS⁺ (%) = $(1 - A_0/A_1) \times 100$59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 GERAL.....	22
3.2 ESPECÍFICOS.....	22
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
4.1 FLAVONÓIDES: ASPECTOS GERAIS, CLASSIFICAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	23
4.2 FLAVONÓIDES ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO	31
4.3 FLAVONÓIDES E CÂNCER.....	32
4.4 FLAVONÓIDES E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.....	34
4.5 FLAVONÓIDES, INFLAMAÇÃO E IMUNOMODULAÇÃO.....	37
4.6 FLAVONÓIDES E LEISHMANIOSE.....	38
4.7 QUERCETINA – ASPECTOS GERAIS.....	39
4.8 QUERCETINA – ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	40
4.9 QUERCETINA - ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS.....	44
4.10 QUERCETINA - ASPECTOS (BIO)FARMACOLÓGICOS.....	45
4.11 QUERCETINA- ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS.....	46
4.12 QUERCETINA - ASPECTOS FARMACODINÂMICOS.....	50
4.13 QUERCETINA - MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS	53
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
5.1 MATERIAIS DE CONSUMO.....	56
5.1.1 REAGENTES E VIDRARIAS.....	56
5.2 MATERIAIS PERMANENTES.....	56
5.2.1 EQUIPAMENTOS.....	57
5.3 SÍNTESE DO DERIVADO QUERCETINA-PENTAACETATO (Q5)	57
5.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA QUERCETINA PENTAACETATO.....	58

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] - ABTS•+.....	59
5.6 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	60
5.6.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA).....	60
5.6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA.....	61
5.6.3 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	62
5.6.3.1 SUBSTÂNCIAS.....	62
5.6.3.2 ANIMAIS.....	62
5.6.3.3 CULTURA DE MACRÓFAGOS.....	62
5.6.3.4 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA.....	63
5.6.3.5 DOSAGEM DE TNF.....	63
5.6.3.6 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO.....	64
5.6.4 ATIVIDADE ANTICÂNCER.....	64
5.6.4.1 SUBSTÂNCIAS.....	64
5.6.4.2 CÉLULAS.....	64
5.6.4.3 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA.....	65
5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	66
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
6.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO ANÁLOGO QUERCETINA PENTAACETATO (Q5)	67
6.1.1 ANÁLISE POR RMN ¹ H E ¹³ C.....	69
6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	76
6.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	77
6.4 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA.....	79
6.5 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA... ..	81
6.6 ATIVIDADE ANTICÂNCER.....	83
7. CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS.....	92

ANEXOS

Anexo A. Artigo científico publicado na revista "Molecules" (Qualis A1).

1. INTRODUÇÃO

Flavonóides são compostos químicos de ocorrência natural amplamente distribuídos, em espécies vegetais (EBEGBONI; DICKENSON; SIVASUBRAMANIAM, 2019). O interesse pelos flavonóides é diverso e, decorre de suas propriedades físicas e químicas; como alguns apresentam cor, podem ser usados como pigmentos e agregarem valor nutricional para os alimentos (SIMÕES et al., 2007). Em adição, apresentam diversas ações farmacológicas, com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais, antivirais, dentre outras (MAUÉS et al., 2019; RENGASAMY et al., 2019; WANG; LI; BI, 2018; WU et al., 2019). Atualmente, são conhecidos mais de 9.000 flavonóides, o que compreende uma das maiores famílias de produtos naturais, sendo essenciais para o metabolismo e interações das plantas com o meio ambiente, seja servindo como linha de defesa contra ataques de patógenos ou, até mesmo na proteção contra a radiação ultravioleta (UV) (WANG; LI; BI, 2018; WANG; CHEN; YU, 2011).

A quercetina ou 3, 3', 4', 5, 7 – pentahidroxiavona é um flavonóide do tipo flavonol ubiquamente presente em frutas e vegetais (MUROTA; TERAOKA, 2003). Nas plantas, ocorrem principalmente como glicosídeos, nos quais um ou mais grupos de açúcar estão ligados a grupos fenólicos por ligações glicosídicas. Podem ocorrer também como aglicona, sem a presença de açúcares ligados na estrutura da molécula (BIESAGA et al., 2016). Numerosos estudos *in vitro* revelaram diversos efeitos biológicos da quercetina, destacando-se as atividades antioxidante, antileishmaniana, antimicrobiana, anti-inflamatória e anticancerígena, bem como atividades neuroprotetoras e anti-isquêmicas (COSTA et al., 2016; FONSECA-SILVA et al., 2011; LAKHANPAL; RAI, 2007; PARK; SHAH; KOH, 2018; WANG; LI; BI, 2018).

Embora as plantas, contendo quercetina, exibam potenciais como modalidades terapêuticas na neuropatologia e no câncer, os dados da literatura científica destacam a necessidade de elucidar questões sobre a sua biodisponibilidade, bem como sua correlação com a eficácia em biomarcadores em seres vivos (DAJAS, 2012). No entanto, a reduzida solubilidade em água, a baixa biodisponibilidade, a rápida depuração no corpo (intenso metabolismo) e degradação enzimática dificultam o uso da quercetina como agente terapêutico (MASSI et al., 2017).

Esforços de pesquisas têm sido focados na modificação do arcabouço (estrutura química) da quercetina para obter análogos com propriedades, potencialmente melhoradas, para diversas aplicações clínicas (MASSI et al., 2017). O uso de culturas celulares pode estabelecer a natureza da atividade biológica e, ainda, sinalizar preliminarmente, o possível mecanismo dos efeitos dos compostos testados diretamente no nível celular, bem como considerar efeitos sinérgicos e ou multidirecionais das misturas dos compostos testados (KANE; MISHRA; DUTTA, 2016).

Dessa forma, neste trabalho, foi sintetizado um análogo penta acetilado da quercetina (Q5) e foram investigadas as potencialidades biológicas da quercetina e do análogo Q5, por meio de ensaios de atividade antioxidante e dos efeitos antimicrobianos, antiparasitários, anti-inflamatórios e anticancerígenos destes compostos, frente a culturas celulares de diversas linhagens.

2. JUSTIFICATIVA

Os compostos naturais forneceram substâncias químicas importantes (por exemplo, taxóis, estatinas e ciclosporina), com papéis de muito sucesso na farmacoterapia moderna (FALLARERO; HANSKI; VUORELA, 2014). Registram-se, ainda, medicamentos antimicrobianos de origem natural – compostos naturais ou suas modificações semi-sintéticas que representam mais de 65% de todos os agentes antibacterianos aprovados nos últimos 30 anos (CRAGG; NEWMAN, 2013). Adicionalmente, destacam-se os fármacos anticâncer, nos quais 50% de todos os medicamentos existentes são produtos naturais ou moléculas deles derivados (NEWMAN; CRAGG, 2012).

O interesse nas propriedades físicas, químicas e biológicas de flavonóides tem levado a um intenso esforço sintético, na busca de meios alternativos para a obtenção de vários compostos. Como do ponto de vista funcional, os grupos hidroxilas das moléculas não são tão importantes, a modificação seletiva desses grupos passa a ter grande valor. A esterificação é um ponto de partida para a obtenção de moléculas com atividades biológicas melhoradas. Dessa forma, várias rotas, dentre elas a acetilação (enzimática ou química) já foram e, estão sendo, objetos de investigação da síntese química (MATTAREI et al., 2010).

Substâncias com atividades biológicas potenciais são destinadas a serem utilizadas, subsequentemente, em contato com sistemas vivos e, como via de regra, são testadas quanto à sua toxicidade, em um primeiro estágio. Certamente, os métodos clássicos de avaliação da toxicidade de substâncias biologicamente ativas em animais ainda são dominantes em experimentos. No entanto, métodos alternativos aos testes experimentais clássicos em animais, usando modelos de culturas de células animais são, cada vez mais, encontrados em estudos toxicológicos. Além de resolver os problemas éticos associados ao uso em massa, e morte de animais experimentais, esses métodos podem reduzir, significativamente o custo e o tempo de estudos preliminares de novas drogas, principalmente na fase de ensaios pré-clínicos (RASSI FERNANDES; RIBEIRO PEDROSO, 2017). Outra vantagem indubitável de modelos *in vitro* é a capacidade de trabalhar com substâncias de teste diretamente em culturas celulares humanas ou animais, o que torna os dados obtidos mais adequados do que quando são projetados em outros modelos.

Ensaio de citotoxicidade são considerados, primariamente, para avaliar o potencial de um composto químico em induzir alterações no comportamento e nos processos celulares resultando em morte, pois as células exibem respostas específicas após a exposição a diversas drogas, produtos químicos ou estresses físicos. Atualmente, os exames dessas respostas celulares, como alterações morfológicas, danos à membrana, irregularidade nos processos bioquímicos e condensação nuclear, estão sendo realizados com frequência para avaliar os riscos potenciais associados a um produto químico (MAHTO; CHANDRA; RHEE, 2010).

Neste contexto, a busca de novos compostos modificados seletivamente, derivados de produtos naturais vem estimulando o desenvolvimento de estudos para avaliação de atividades antioxidantes, antimicrobianas, antiparasitárias, anti-inflamatórias e anticancerígenas, frente a culturas celulares de diversas linhagens. E, portanto, o presente trabalho foi delineado nesta perspectiva.

A prevalência de distúrbios neurodegenerativos está aumentando, devido, em parte, a extensões no tempo de vida. Atualmente, não há cura para nenhuma dessas doenças, embora não por falta de tentativa. Estima-se que o número de indivíduos com demência em todo o mundo quase duplique a cada 20 anos, passando de 35,6 milhões em 2010 para 65,7 milhões em 2030 e 115,4 milhões em 2050 (PRINCE et al., 2013). À medida que a população mundial envelhece, espera-se que o número de indivíduos afetados por distúrbios neurodegenerativos relacionados à idade aumente, rapidamente, como por exemplo, para a doença de Alzheimer (DA), onde se espera que a prevalência dobre nos próximos 30 anos (MASCI et al., 2015). Logo, a avaliação de compostos com potencial antioxidante se torna uma ferramenta fundamental para a busca de novos produtos capazes de prevenir, atenuar e, quiçá até curar, distúrbios neurodegenerativos que incapacitam e afetam a qualidade de vida de indivíduos, em todo o mundo.

As doenças infectocontagiosas, tais como as infecções bacterianas e fúngicas como também, as negligenciadas, por exemplo a Leishmaniose, afetam a população brasileira, como em grande parte dos continentes americano, asiático, europeu e africano, sendo necessário a criação prioritária de programa de controle (COSTA, 2005). Sabe-se dos efeitos de flavonóides contra formas parasitárias de *Trypanosoma brucei*, e *Leishmania donovani*, entretanto são poucos os estudos sobre o mecanismo de ação desses compostos (FONSECA-SILVA et al., 2011). Os mecanismos de ação não estão apenas relacionados às propriedades de quelação, mas também de

múltiplos alvos que têm sido identificados para o tratamento da leishmaniose que incluem: arginase, ribonucleotídeo redutases, topoisomerase II e disfunção mitocondrial, o que faz desses análogos interessantes para a busca de novos fármacos com ação antileishmania e com propriedades anti-inflamatórias (MARYAM MOHAJERI, LOTFOLLAH SAGHAEI et al., 2019).

Câncer corresponde a um conjunto de diferentes doenças que compartilham o fato de apresentarem um crescimento celular desordenado, com capacidade de invadir tecidos e órgãos, podendo disseminar-se para outras regiões do organismo. Seus diferentes tipos representam uma das principais causas de morte no mundo e, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2018, cerca de 18,1 bilhões de pessoas ao redor do mundo tiveram câncer e, 9,6 milhões morreram dessa doença. Ainda, estima-se que, até 2040, esses números quase dobrarão, com aumento nos países de baixa e média renda, onde mais de dois terços de câncer no mundo ocorrerão. O câncer causa cerca de 30% de todas as mortes prematuras por doenças não transmissíveis entre adultos de 30 a 69 anos (WHO, 2020). Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2020). O câncer vem aumentando, em parte pelo envelhecimento, pelo crescimento populacional, como também pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco de câncer, especialmente aos associados ao desenvolvimento socioeconômico (WHO, 2020).

Tendo em vista que, ainda, existem poucas alternativas terapêuticas naturais, esse trabalho visa contribuir para a busca de compostos, a partir de modificações químicas (síntese orgânica) de substâncias capazes de exibir atividades antioxidantes, antiparasitárias, anti-inflamatórias e anticancerígenas, bem como, com propriedades potenciais para o tratamento de doenças isquêmicas e neurodegenerativas.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Performar a modificação estrutural na molécula da quercetina (Q) padrão para a obtenção do análogo quercetina pentaacetato (Q5), com vistas à investigação de efeitos biológicos potenciais dos compostos frente a culturas celulares.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial antioxidante de Q5, em comparação com a molécula da quercetina padrão.
- Observar o perfil antimicrobiano (antibacteriano e antifúngico) da Q e do Q5.
- Analisa a atividade antileishmania da Q e do Q5.
- Obter o perfil anti-inflamatório da Q e do Q5, frente a culturas de macrófagos ativados.
- Avaliar a atividade anticancerígena e o comportamento citotóxico da Q e do Q5.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 FLAVONÓIDES: ASPECTOS GERAIS, CLASSIFICAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Polifenóis são substâncias comumente encontradas em plantas e fazem parte dos elementos básicos da dieta. Um dos grupos mais estudado de polifenóis são os flavonóides. A relevância dos flavonóides não se dá apenas pelas suas propriedades organolépticas ou por razões tecnológicas, mas, também, devido ao seu potencial como promotor de efeitos benéficos à saúde. São responsáveis pelas cores avermelhadas e azul-escuras dos frutos, bem como pelas colorações amarelo e laranja das frutas cítricas (BRODOWSKA, 2017).

Flavonóides com atividades biológicas são frequentemente chamados de bioflavonóide (BRODOWSKA, 2017). Os flavonóides foram citados, pela primeira vez, pelo fisiologista e vencedor do prêmio Nobel, o húngaro Dr. Albert Szent-Györgyi, em 1936, quando o mesmo provou que a substância isolada se tratava de um importante venotônico com propriedade ativa sobre a permeabilidade capilar e, sendo assim, propôs o termo vitamina P (Rutina) (USZNYÁK, ST .; SZENT-GYÖRGYI, 1936).

Os flavonóides são sintetizados na natureza, a partir da via dos fenilpropanóides, e possuem seus nomes triviais, na maioria, empregados em relação com a planta na qual foram, pela primeira vez, identificados; assim, a quercetina foi primeiramente isolada de *Quercus sp* (SIMÕES et al., 2007). A denominação bioflavonóide, frequentemente, é encontrada na literatura quando se trata de um flavonóide com atividade biológica. Esses compostos apresentam diversas ações farmacológicas, como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais, antivirais, dentre outras (MAUÉS et al., 2019; RENGASAMY et al., 2019; WANG; LI; BI, 2018; WU et al., 2019).

Dessa forma, esses compostos podem ser encontrados na natureza como formas glicosiladas ou esterificadas, consistindo de anéis C6-C3-C6, chamados de anéis A e B ligados pelo carbono 3 do anel C (Figura 1) (WANG; LI; BI, 2018)

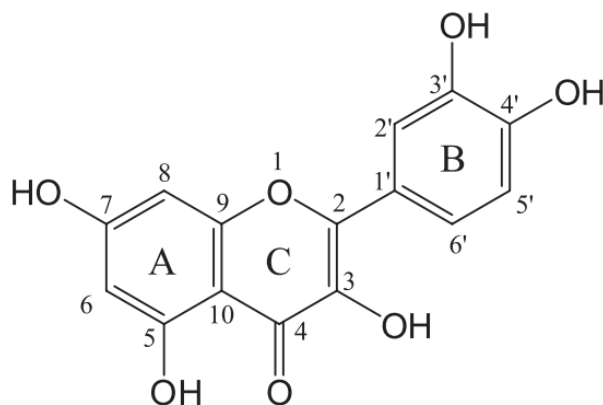


Figura 1. Esqueleto estrutural da quercetina
(Adaptado de Lesjak *et al.*, 2018).

Os flavonóides são categorizados de acordo com o esqueleto estrutural como flavonol, flavanol, flavona, flavanona, antocianidina e isoflavona (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação dos bioflavonóides e efeitos biológicos já demonstrados

CLASSIFICAÇÃO	ATIVIDADE BIOLÓGICA
FLAVANÓIS	
Catequinas	Redução da modificação covalente de proteínas induzidas por radicais livres (ROS), ou subprodutos do estresse oxidativo Inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) Propriedades antiescleróticas Inibem proliferação celular e induzem apoptose Modulador e inibidor da atividade do fator nuclear kappa B (NFKB)
Epigallocatequina-3-galato	Atividade anticancerígena e inibidor de uroquinase
ANTOCIANIDINAS	
Malvidina Delfinidina-3-glicosídeo Petunidina-3-glicosídeo Peonidina-3-glicosídeo	Protegem contra o fator de necrose tumoral (TNF α -1) induzido de proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1) excretadas em células endoteliais
Delfinidina	Previne a expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) Impede a ativação de proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK) e c-Jun N-terminal quinase (JNK)

Cianidina-3- β -glicosídeo Peonidina-3-glicosídeo	Influenciam na distribuição do colesterol através da proteção de células endoteliais contra o cluster de diferenciação 40 (CD40), na indução de sinalização pró-inflamatória
Delfinidina Cianidina Delfinidina-3-galactosídeo	Dissolvem fibrilas e intermediários que induzem a reações de dobramento protéico
Petunidina Malvidina Pelargonidina Peonidina	Protegem a integridade do ácido desoxirribonucleico (DNA) e reforça os níveis antioxidantes teciduais
FLAVANONAS	
Naringenina	Inibição de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos e redução da produção de nitrato e nitrito, minimizando danos ao DNA Inibe a proliferação e desenvolvimento de tumores, proteção contra danos do sol ao DNA por sua capacidade de absorver luz ultravioleta (UV) Ativação do fator nuclear 2 relacionado ao eritróide 2 (Nrf2), aumento dos níveis de parkina DJ1; inibidor de colinesterase
Hesperitina Naringenina	Inibição do câncer de mama induzido por 7,12-dimetil-benzil-antraceno em ratos fêmeas

FLAVONOÍIS

Kaempferol	Inibem o crescimento das células cancerosas e a angiogênese Geram apoptose na célula cancerosa e mantem a viabilidade celular normal
Miricetina	Melhora a resistência à insulina, anti hiperlipidemia e anti inflamação Anti-aldose redutase, agente eficaz para parar de fumar
Quercetina	Reduz β-amiloidose extracelular, taupatia, astrogliose e microgliose pela diminuição da atividade da enzima β-secretase 1 (BACE1) em mediar a clivagem da proteína precursora amiloide (APP), em fragmento C-terminal (CTFβ) Aumenta a defesa antioxidante das enzimas glutathiona (GSH) e superóxido dismutase (SOD) e aumento dos níveis de dopamina

ISOFLAVONAS

Daidzeína Genisteína	Ligam-se a receptores de estrógeno- beta (ER-β) que são receptores essenciais no sistema nervoso central, bem como em sistemas cardiovasculares Efeitos antioxidantes nos vasos sanguíneos Podem reduzir câncer de mama e possuem influência no estado hormonal e regulação do ciclo menstrual
Daidzeína	Inibem isoenzimas de álcool desidrogenase (ADH-I) e a aldeído desidrogenase mitocondrial humana (ALDH-2)
Genisteína	Diminuição do índice de massa corpórea (IMC), circunferência da cintura, peso e massa total de gordura corporal em mulheres pós-menopausa

FLAVONAS

Apigenina Luteolina	Antibacterianos, antiflogístico e antiespasmódicos
Apigenina	Possuem baixa toxicidade em células normais comparados com células cancerosas
Luteolina	Propriedades anti inflamatórias, anticarcinogênicas e antioxidantes Inibem benzo pireno e a mutagênese bacteriana induzida por 2-aminoantraceno Fazem quelação metálica, sequestram radicais livres e estimulam enzimas de desintoxicação de fase II em cultura celular e em modelos tumorais <i>in vivo</i> Inibem ornitina descarboxilase, uma enzima que desempenha um papel essencial na promoção do tumor. Anticancerígenos em um modelo de carcinogênese da pele Propriedades anticancerígenas relacionadas à indução da apoptose Regulação de quinases proteicas e regulação Redox Inibição de metástase celular, proliferação e angiogênese Sensibilizam células cancerígenas para citotoxicidade, estimulando caminhos para apoptose Antioxidantes através da proteção ou indução de antioxidantes endógenos como: glutathione redutase (GRS), glutathione S-transferase (GST), e SOD
Baicaleína	Inibe a atividade de NF-κB, ERK e JNK, modula o balanço metabólico entre glutamato e ácido gama aminobutírico (GABA), atenua o stress oxidativo, disfunção mitocondrial, inibe a formação de fibrilas de alfa sinucleína

Fonte: Produzida pelo autor como base nos dados de (BRODOWSKA, 2017; COSTA *et al.*, 2016).

Flavanóis constituem um grande grupo de polifenóis que variam de forma monomérica ou polimérica formando os taninos, ocorrendo em frutas e em produtos derivados de frutas como sucos ou geleias. Também, aparecem em chás, vinho e chocolates. É descrito na literatura que Flavanóis podem estimular os níveis de óxido nítrico na corrente sanguínea de fumantes e reverter alguns danos relacionados ao cigarro no vaso sanguíneo (BRODOWSKA, 2017). Estudos epidemiológicos têm associado o consumo de bebidas e alimentos ricos em bioflavonóides à prevenção de doenças neurológicas. Isso se deve, não apenas, à capacidade de alguns desses compostos em atravessar a parede intestinal e a barreira hematoencefálica de mamíferos, mas principalmente pela capacidade desses compostos em interagir com peptídeos e proteínas (HASSAAN et al., 2014).

Antocianidinas são um grupo de pigmentos naturais responsáveis pela cor azul, vermelho, púrpura e laranja, presente em muitas frutas e vegetais. Antocianidinas demonstraram possuir efeitos em doenças cardiovasculares, metabolismo do colesterol, acuidade visual, além de possuir eficácia antioxidante e ter efeitos sobre a citotoxicidade (BAGCHI et al., 2004). Antocianidinas são capazes de agir em diferentes tipos de células que participam do desenvolvimento da aterosclerose, e demonstraram possuir efeito protetor contra a indução da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), pelo TNF- α em células endoteliais (GARCIA-ALONSO et al., 2009).

Flavanonas são extremamente disseminadas em plantas das famílias *Leguminosae* e *Rutaceae*, pertencem ao grupo de compostos flavonóides frequentemente encontrados no mundo, e constituem parte da dieta humana, assim como também são encontradas em plantas medicinais. A maioria das propriedades farmacológicas das flavanonas são: sequestro de radicais livres, anti-inflamatórias, anticâncer e antiviral, além de efeitos cardiovasculares que lhes conferem clara significância como potencial farmacológico (KHAN; DANGLES, 2013). A naringenina, principal flavonóide dessa classe, tem sido estudada frente ao seu papel neuroprotetor. Foi observado que protegem animais da neurotoxicidade induzida pela oxidopamina (6-OHDA), agindo na manutenção da substância negra e dos níveis de dopamina no estriado. Evento que foi dependente do aumento nos níveis de Nrf2 e ativação do elemento de resposta antioxidante (ARE) tanto *in vitro* como *in vivo* (COSTA et al., 2016).

Flavonóis são um dos subgrupos de flavonoides que são mais analisados, devido a sua importância no que se refere às suas propriedades antioxidantes e aos seus efeitos biológicos. Esse grupo de compostos químicos ocorrem em vegetais, frutas e bebidas derivadas de plantas como vinho tinto e chás. A ingestão de flavonóis está relacionada à redução do risco de doenças cardiovasculares (BRODOWSKA, 2017). Esses efeitos podem ser imputados para além de suas propriedades antioxidantes, o que tem sido interesse em muitas linhas de pesquisa. Por possuírem efeitos pleiotrópicos, esses flavonoides podem comportar-se como “balas mágicas” no tratamento de diversas doenças, agindo como candidatos que podem ser considerados protótipos para o design racional de drogas baseado na inibição rotas patológicas ou na indução de mecanismos de sobrevivência celular (DA SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012; DAJAS, 2012).

Isoflavonas são amplamente encontradas em legumes, principalmente na soja. As Isoflavonas possuem um anel 2- fenilcromenona característico. Esses compostos têm sido utilizados na composição de vários alimentos vegetarianos e em preparações de alimentação infantil. Esses compostos podem se ligar a receptores de estrógeno beta (ER), que são essenciais no sistema nervoso, assim como em sistemas cardiovasculares, além de possuírem ação antioxidante na corrente sanguínea (BRODOWSKA, 2017). Também, é bem documentado o papel das Isoflavonas na prevenção de vários tipos de câncer, agindo como agentes quimioprotetores (RAÚL F. GUERREROA, MARIA C. GARCÍA-PARRILLAB, 2010; ZHAO et al., 2007). Além disso, é bastante difundido o seu uso em aditivos alimentares para atenuar o transtorno relacionado à menopausa, sendo comprovada a sua atuação em regulação hormonal e perda óssea, através do estímulo em osteoblastos (MORABITO et al., 2002).

As flavonas, assim como os flavonóis, fazem parte de um grupo de flavonoides de origens biossintéticas muito próximas, haja vista que as flavonas são substituídas na posição C-3 por uma hidroxila, o que se justifica, uma vez que suas análises, síntese e reações químicas possuem uma base teórica comum (SIMÕES et al., 2007). A apigenina é o principal componente dessa classe, responsável por efeitos antibacterianos, antiflogísticos, antiespasmódicos e anticarcinogênicos (BRODOWSKA, 2017). Também, tem

sido relatado que esses compostos são capazes de se quelar-se com metais, sequestrar radicais livres e estimular enzimas do metabolismo de fase II (LIN et al., 2008).

4.2 FLAVONÓIDES: ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO

A inflamação é um mecanismo de proteção contra a invasão de patógenos e injúria tecidual. Durante a inflamação, o processo de produção de moléculas pró inflamatórias tais como óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral alfa (TNF), interleucinas IL - 1 β e IL-6, juntamente com quimiocinas e eicosanóides, promovem o recrutamento de leucócitos e dano tecidual. Logo, a redução de mediadores inflamatórios pode atenuar o dano tecidual, em doenças inflamatória (RUIJTERS et al., 2016).

Radicais livres são espécies reativas contendo um ou mais elétrons desemparelhados, tais como o radical óxido nítrico (NO $\cdot$), o radical oxigênio superóxido (O $_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H $_2$ O $_2$) que são produzidos durante o metabolismo normal e desempenham várias funções celulares úteis. A produção excessiva de O $_2^{\cdot-}$ e H $_2$ O $_2$ podem resultar em dano tecidual, o que frequentemente envolve a geração do radical hidroxila (OH $\cdot$) altamente reativo e outros oxidantes na presença dos íons ferro (Fe $^{2+}$) catalítico ou íon cobre (Cu $^{2+}$) (GERLACH et al., 2002). O estresse oxidativo é resultante do aumento da produção de radicais livres e/ou defeitos nas defesas antioxidantes, por exemplo, as enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutatona (GSH), que podem ser centrais para o desenvolvimento de processos patológicos (BEAL, 1997).

Sabendo das propriedades anti-inflamatórias dos flavonóides, Ruijters e colaboradores (2016) verificaram a atuação desses compostos na resistência ao cortisol em inflamações crônicas e doenças autoimunes. Estes autores, descobriram que a maioria dos bioativos apresentaram uma ação importante na resposta ao cortisol em preservar seus efeitos anti-inflamatórios, o que ilustra claramente o quão interligados estão o estresse oxidativo e a inflamação (RUIJTERS et al., 2016). O papel da inflamação e do estresse oxidativo estão intimamente relacionados ao processo de oncogênese (TRABER, 1999). Além disso, a inflamação crônica é um fator crítico na patogênese de muitas

doenças, incluindo câncer e doenças neurodegenerativas (LUCAS; RUSSELL; KEAST, 2011).

4.3 FLAVONÓIDES E CÂNCER

O câncer é um problema de saúde crescente ao redor do mundo e, recentes estudos têm estimado que mais de dois terços dos cânceres humanos poderiam ser prevenidos através da mudança em um estilo de vida apropriado. Tal fato se baseia em dados estatísticos e epidemiológicos onde, aproximadamente, 35% da mortalidade pelo câncer em humanos é atribuída à dieta (BRAGANHOL et al., 2006). Reconhece-se que os flavonóides, derivados da dieta, possuam, além das atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, atividades antiangiogênicas, anticarcinogênicas e antiproliferativas (SAK, 2014).

Essas moléculas promovem proteção significativa contra o câncer, agindo em todos os estágios do processo carcinogênico por inibir, reverter ou retardar a tumorigênese. Os flavonóides estimulam o sistema imune, sequestram radicais livres, modulam atividades enzimáticas, alteram o ciclo mitótico, modificam a expressão genética e induzem apoptose através de diferentes caminhos de sinalização. Flavonóides podem, também, ser considerados como promissores quimiopreventivos e agentes quimioterápicos contra vários tipos de cânceres humanos (ANGST et al., 2013).

A ação dos flavonóides têm sido demonstradas para os diferentes tipos de câncer. Na classe dos flavonóis, a quercetina e o kaempferol têm sido os mais ativos, e amplamente estudados contra vários tipos de células de roedores e de humanos (CAROCHO; FERREIRA, 2013). A quercetina provou ser efetiva, contra leucemia mieloide crônica, leucemia linfocítica aguda, linfoma de Burkitt em termos de mudanças morfológicas, condensação da cromatina nuclear, fragmentação nuclear e indução de apoptose (TAN et al., 2003). Em células humanas, a quercetina demonstrou inibir a angiogênese, migração, e proliferação em adenocarcinoma gástrico, carcinoma hepatocelular e adenocarcinoma de pulmão. Linhagens celulares de câncer de próstata agressivo, também foram inibidas pela quercetina (NAIR et al., 2004). O Kaempferol possui propriedades

anticâncer e foi relatado por inibir linhagens celulares de osteosarcoma, assim como observou-se redução do osteosarcoma *in vivo* (HUANG et al., 2010).

Dentre a classe das flavonas, a molécula mais representativa é a crisina, que demonstrou resultados na inibição de vários tipos de cânceres como carcinoma humano nasofaríngeo, câncer colorretal, carcinoma de cérvix, e linhagens celulares de hepatoma, em estudos de sinergismo (CAROCHO; FERREIRA, 2013). A catequina é o composto mais ativo da classe dos flavonóis, conhecida por prevenir metástase de melanoma, em modelos de roedores (MENON; KUTTAN; KUTTAN, 1999).

Dentre as Isoflavonas, as que mais se destacam são a genisteína e daidzeína. A genisteína foi relatada pela inibição de células de câncer de próstata, de forma concentração dependente, além de sensibilizarem tumores para a quimioterapia com gemcitabina e cisplatina, contra câncer pancreático, câncer de ovário e câncer cervical (BANERJEE et al., 2005; WANG; ELTOUM; LAMARTINIERE, 2002). A daidzeína é reconhecida por demonstrar atividade contra câncer de mama, inibindo a proliferação celular (LIU et al., 2012). Similarmente xenoenxertos de tumores mamários humanos foram acentuadamente inibidos pela associação da genisteína com tamoxifeno (CONSTANTINO et al., 2005).

A hesperidina é a molécula da classe das flavanonas de maior importância, quanto aos relatos de atividade anticâncer, têm sido descrita como inibidora *in vitro*, de células epiteliais de carcinoma humano nasofaríngeo e em linhagens celulares de câncer de mama (LI et al., 2010; NATARAJAN et al., 2011).

Vários compostos da família das Antocianidinas têm sido estudados para atividade anticâncer e muitos deles têm demonstrado propriedades quimioterapêuticas, tanto *in vitro* como *in vivo* (CAROCHO; FERREIRA, 2013). A delphinidina demonstrou inibir linhagens celulares de câncer de próstata (HAFEEZ; SIDDIQUI; ASIM, 2008). Também cianidina e peonidina – 3-glicosídeo demonstraram resultados satisfatórios contra carcinoma de pulmão e carcinoma colorretal (CVOROVIC et al., 2010; HO; CHEN; CHEN, 2010).

Devido à limitada eficácia em monoterapia, a prática clínica corrente para o tratamento de diferentes formas de câncer inclui a coadministração de fármacos, com o intuito de atingir múltiplos alvos moleculares, em uma via celular

simples ou paralela, assim como endereçar contra o mesmo alvo, através de diferentes mecanismos de ação, para maximizar a eficácia, minimizar a toxicidade e superar a resistência celular à quimioterapia (FRATANTONIO et al., 2019). Flavonóides podem exercer sua atividade regulatória nas células por agirem em diferentes vias de transdução de sinais, tais como kinases dependentes de ciclina, (CDKs), caspases, proteínas da família Bcl-2, fostatidilinositol -3-Cinase/AKT e MAPK, que são relevantes em processos patológicos, incluindo inflamação e câncer (GUPTA; HUSSAIN; MUKHTAR, 2003; MAUÉS et al., 2019).

Flavonóides, da classe dos flavonóis, têm sido relatados pelo seu efeito citotóxico, em várias linhagens de tumores celulares de diferentes origens, assim como, em modelos de câncer animais induzidos (ANGST et al., 2013; BRODOWSKA, 2017). Em adição, regimes de combinação de componentes naturais com agentes quimioterápicos padronizados, têm sido muito promissores em promover um efeito sinérgico ou, ainda, por induzir uma quimiossensibilização (BANERJEE et al., 2008).

4.4 FLAVONÓIDES E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

Muitas doenças neurodegenerativas têm sido associadas ao estresse oxidativo. O aumento da produção de radicais livres e/ou defeitos nas defesas antioxidantes podem ser centrais na doença de Parkinson (DP), esclerose lateral amiotrófica, Doença de Alzheimer (DA), dentre outras (BEAL, 1997)

Neuroinflamação e estresse oxidativo estão envolvidos na degeneração dos neurônios dopaminérgicos na DP. A pigmentação de neurônios contendo neuromielina na substância negra resulta da oxidação da dopamina em neuromielina. Os grupos hidroxilas, no anel catecol da dopamina, se oxidam em grupos carbonil gerando quinonas. Dopamina se oxida em dopamina orto-quinona que é completamente instável em pH fisiológico e cicliza-se espontaneamente em aminocromo. O Aminocromo é a quinona mais estável formada durante a oxidação da neuromielina, e foi proposto ser a neurotoxina

que dispara os mecanismos de neurodegeneração do sistema nigroestriatal na DP (SILVA; SEGURA-AGUILAR, 2021).

O cérebro é particularmente, vulnerável ao excesso de radicais livres. No tecido neural, o estresse oxidativo pode resultar na interrupção da sinalização e homeostase (COSTA et al., 2016). Assim, os processos inflamatórios desempenham um papel importante na progressão de um número de doenças neurodegenerativas e a ativação de células micróglias, macrófagos residentes no sistema nervoso central (SNC), é um importante passo inicial da resposta inflamatória. Suas funções primárias são promover a defesa do hospedeiro, destruindo patógenos invasores e removendo detritos, promovendo a reparação tecidual e facilitando a homeostase, em parte por sua influência nos astrócitos e neurônios circunvizinhos (GLASS et al., 2010).

Na DA, estudos forneceram evidências de estresse oxidativo e níveis aumentados de peroxidação lipídica nas membranas celulares, alterações em enzimas antioxidantes como catalase e superóxido dismutase e aumento da oxidação e nitração de proteínas (KLINGEMANN; TESCH; WÄSCH, 1997). Após exposição à citocinas pró-inflamatórias e/ou lipopolissacarídeos (LPS), são ativadas vias de transdução de sinais específicas que regulam a indução de óxido nítrico sintase induzível (INOS) e outros mediadores oxidativos e inflamatórios (SPENCER et al., 2012). Portanto, a supressão da ativação microglial pode levar a uma restauração mais precoce da homeostase e resolução da neuroinflamação (SIMONYI et al., 2015).

Flavonóides estão sendo amplamente estudados em doenças neurodegenerativas, como por exemplo, aqueles oriundos de extratos de plantas brasileiras, pois induzem a um amplo espectro de respostas em astrócitos e neurônios em cultura, como ativação de astrócitos, diferenciação neuronal e neuritogênese (COSTA et al., 2016). Lee e colaboradores (2016) observaram uma redução do efeito inflamatório em células de micróglia estimuladas *in vitro* com lipopolissacarídeos (LPS) e tratadas com o flavonóide tangretina. Nesse estudo, a tangretina, um flavonóide encontrado em cascas de frutas cítricas, diminuiu os níveis da produção de óxido nítrico induzida pelo LPS, inibiu a produção do fator de necrose tumoral alfa e de citocinas como IL-6 e IL1 β , assim como inibiu a expressão de RNA mensageiro (mRNA) induzida por LPS da INOS (LEE et al., 2016). No trabalho de Dourado e colaboradores (2020), o flavonóide

apigenina foi avaliado, frente a modelos de neuroinflamação (*in vitro*), associados com a DA. Nesse estudo, foi observado que a apigenina preservou a integridade de neurônios e astrócitos e apresentou efeito neuroprotetor, além disso, a molécula demonstrou reduzir a ativação microglial e apresentou atividade imunomoduladora, por diminuir a expressão do marcador inflamatório CD68 (DOURADO et al., 2020). A agatisflavona demonstrou possuir potencial farmacológico para células do sistema nervoso, nos estudos realizados por Almeida e colaboradores (2020), nos quais, co-culturas de neurônios e células gliais foram expostas a fatores inflamatórios como LPS e IL-1 β , e tratados com o flavonóide.

Bispo e colaboradores (2017) evidenciaram que o flavonóide rutina, extraído de sementes de *Dimorphandra mollis*, possui a propriedade de promover a proliferação microglial, especialmente induzindo a polarização para o perfil M2, o que demonstra que a resposta microglial melhorada pode ser considerada como uma estratégia para prevenção de distúrbios neurodegenerativos associados à neuroinflamação (BISPO DA SILVA et al., 2017). Sabe-se que essas células transformadas possuem perfis diversos que as classificam como fenótipos M1 e M2. A única característica que coloca essas células na classificação M2 é que elas expressam mediadores ou receptores com capacidade de diminuir, reparar ou proteger o corpo da inflamação (CHERRY; OLSCHOWKA; O'BANION, 2014).

Pôrto (2001) publicou um trabalho a respeito do uso de radicais livres e neurodegeneração, demonstrando a associação entre o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica. Propôs, também, o uso de antioxidantes como base para uma nova terapia para neurodegeneração, DA, doença de Parkinson, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, Síndrome de Down e esquizofrenia (PÔRTO, 2001). Mais recentemente, Cardoso, Jackix e Pietro (2016) publicaram uma revisão sistemática sobre o papel dos flavonóides na DA, em que foi evidenciado que a administração oral desses compostos polifenólicos geraram efeito protetor contra DA (CARDOSO; JACKIX; PIETRO, 2016). Recentemente, sabendo-se da fisiopatogenia da DA e da formação de placas amiloides no cérebro por depósito de peptídeos AB na presença de íons metálicos implicados nas lesões oxidativas do cérebro, diversos estudos foram publicados

evidenciando o efeito neuroprotetor do flavonol quercetina (HAQ; ALAMRO, 2019; JEON et al., 2018; MERT et al., 2019).

4.5 FLAVONÓIDES, INFLAMAÇÃO E IMUNOMODULAÇÃO

Respostas imunes anormais estão envolvidas na iniciação e desenvolvimento de um grande número de doenças, incluindo doenças autoimunes, alergias, câncer e doenças neurodegenerativas. Anormalidades na função dos linfócitos e macrófagos são fatores chave para desencadear o desenvolvimento e a manutenção de doenças imunomediadas (DOS SANTOS, 2016)

A ativação do macrófago pelo LPS resulta na liberação de vários mediadores inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias tais como TNF, IL-1, IL-6, IL-8, e IL-12, assim como o óxido nítrico. A produção exacerbada desses mediadores por macrófagos ativados são a principal causa das consequências deletérias da septicemia ou endotoxemia, e podem levar à hipotensão, coagulação intravascular disseminada, extravasamento de neutrófilos para os tecidos, hipóxia tecidual e morte (OLIVEIRA COSTA et al., 2014).

Os flavonóides constituem uma fonte importante de terapias potenciais para um grande número de doenças e extratos ricos e compostos isolados, com potencial atividade anti-inflamatória e imunomoduladora, estão sendo estudados como possíveis alternativas para a utilização clínica (FARHADI et al., 2014). A quercetina, encontrada em altas concentrações nas chalotas (planta bulbosa do género *Allium*), pode exercer efeitos imunomoduladores significativos, por modular a produção celular de citocinas derivadas do perfil TH1 e TH2 (FARHADI et al., 2014). A quercetina, também, possui potentes efeitos na proliferação linfocítica e pode regular a imunidade celular (FARHADI et al., 2014).

4.6 FLAVONÓIDES E LEISHMANIOSE

Leishmanioses são um espectro de doenças consideradas por possuir implicações negativas e muitas consequências para a saúde. Suas ambas manifestações visceral e cutânea são causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, transmitida por flemotomídeos fêmeas de *flebotomus* e *lutzomyia*. A sua forma visceral, conhecida como calazar é amplamente distribuída na África, Ásia, América Latina e em regiões do mediterrâneo. Os parasitas da *Leishmania* infectam 10-12 milhões de pessoas no mundo, com mais de 400 mil novos casos por ano e, essa incidência está associada ao desenvolvimento humano, devastação de florestas, mudanças ambientais e migração de pessoas para áreas endêmicas (MARYAM MOHAJERI, LOTFOLLAH SAGHAEI et al., 2019; MERCADO-CAMARGO et al., 2020)

Na ausência de vacinas e de controle do vetor, a quimioterapia desempenha um papel crítico no controle da infecção por leishmaniose. No entanto, a maioria dos tratamentos disponíveis, apenas, é eficaz na primeira fase da doença ou são difíceis de administrar devido à sua elevada toxicidade, além dos efeitos adversos desses compostos, a resistência associada a essas drogas é crescente (MERCADO-CAMARGO et al., 2020; WONG et al., 2009).

Flavonóides possuem múltiplos alvos, para tratamento de leishmanioses e incluem alvos como arginase, ribonucleotídeo redutase e topoisomerase II. Esses dados fazem dessas moléculas descritas, como por Hamptom (2004) “balas mágicas” no *design* de drogas, que são focados em alvos biológicos simples, o que não deve ser a abordagem ideal para doenças complexas e assim não deveria ser considerado um modelo ideal para o tratamento da leishmaniose (DA SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012; HAMPTON, 2004). Flavonóides como fisetina, luteolina e quercetina demonstraram atividades em culturas de leishmanias e apresentaram baixas toxicidades em células de mamíferos (MANJOLIN et al., 2013).

Flavonoides de extratos de plantas demonstraram excelente atividade em ensaios *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e demonstraram-se proeminentes na atividade leishmanicida, assim como compostos isolados apresentaram atividade significativa contra formas

amastigotas de *L. amazonensis* sem demonstrar efeitos tóxicos para a célula hospedeira (ARAÚJO et al., 2019).

Tasdemir e colaboradores (2005) realizaram um estudo em que avaliaram a atividade antileishmania de flavonóides e seus análogos. Esses autores encontraram resultados promissores para os flavonóides fisetina, luteolina e quercetina, que apresentaram concentração inibitória de 50% (IC-50) de 0,6; 0,8 e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) e suas IC₅₀'s foram quase comparáveis com miltefosina (IC₅₀ 0,34 $\mu\text{g mL}^{-1}$), uma droga antileishmania usada na clínica. Corroboraram, também, a habilidade dos flavonóides em inibir infecções por leishmanias sem causar toxicidade significativa para a célula de mamíferos, entretanto indicaram que a baixa biodisponibilidade desses compostos apontam para o desenvolvimento de formulações mais específicas (TASDEMIR et al., 2006).

Flavonóides são multifacetados e possuem efeitos nas vias de transdução de sinais envolvidos na proliferação celular, atividades antioxidantes e modulação da atividade enzimática associadas à biossíntese de estrogênio e vias metabólicas de agentes cancerígenos (ZHAO et al., 2007). Em doenças parasitárias, flavonóides são um grupo de interesses elevados. É devido à sua baixa toxicidade nos hospedeiros e vários mecanismos pelos quais eles podem modular processos patologicamente alterados durante infecções (FAIXOVÁ et al., 2021).

4.7 QUERCETINA – ASPECTOS GERAIS

O nome quercetina deriva-se do querceto (floresta de carvalhos), pertence à classe química dos flavonóis, de *flavos* que significa amarelo, sua cor comum e tem sido usada desde 1857 (KIM; PARK, 2018) Mais precisamente, a quercetina é o flavonóide mais representativo da família dos flavonóis, componentes que possuem a estrutura 3-hidroxi-flavona (D'ANDREA, 2015). Foi nomeada como 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona pela *Internacional Union of Pure And Applied Chemistry* (IUPAC) (Figura 1).

A quercetina é o flavonóide mais amplamente distribuído e o mais extensivamente estudado. É encontrada em várias fontes incluindo frutas, vegetais, nozes, vinho e sementes, na maioria das vezes, como glicosídeos em

alimentos à base de plantas e têm atraído bastante atenção por seu potencial efeito benéfico em prevenção de doenças (MOON et al., 2000). Por essas e outras razões, é sugerido que a quercetina esteja envolvida em diversos efeitos benéficos à saúde, sendo útil tanto para a dieta diária quanto para nutracêuticos (NGUYEN et al., 2015). Ultimamente, tem sido demonstrado que a quercetina exerce seus efeitos benéficos para a saúde em uma série de modelos celulares e em animais, bem como em humanos, por meio da modulação de vias de sinalização, e expressão gênica envolvidas nesses processos (WANG et al., 2016). Porém, possui aplicação clínica limitada devido a pobre solubilidade em água e, conseqüentemente, reduzida biodisponibilidade (JEON et al., 2018).

4.8 QUERCETINA – ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A quercetina é um componente alimentar com impacto comprovado na saúde. Suas atividades bioquímicas são muito bem documentadas e é um dos mais potentes antioxidantes dentre os polifenóis (FORMICA; REGELSON, 1995; MATERSKA, 2008; WANG; LI; BI, 2018). Diversas são as atividades biológicas encontradas para a quercetina e, o potencial antioxidante da mesma, tem sido evidenciado em diferentes ensaios e em diferentes aplicações (Tabela 2).

Com relação à capacidade de varredura de radicais livres, a quercetina em sua forma aglicona, demonstrou ser a mais reativa dentre os seus derivados no ensaio do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), até mesmo com mais atividade do que o padrão hidroxitolueno butilado (BTH) utilizado. Sabe-se que flavonóides inibem o estresse oxidativo *in vitro* por agirem tanto no sequestro de radicais livres, como sendo agente queladores de metais, a quercetina também exibiu a melhor atividade quando comparada a seus derivados no ensaio que verifica a habilidade de redução do ferro plasmático (FRAP) (LESJAK et al., 2018). Essas propriedades já estão sendo exploradas na busca de compostos capazes de se ligar a íons metálicos no cérebro, agindo por competição com o peptídeo A β , para impedir a progressão da doença de Alzheimer (HAUSER-DAVIS, 2009).

Tabela 2. Atividades biológicas da quercetina já entremostradas

Atividades biológicas	Referências
Por inibir o estresse oxidativo, a quercetina suprimiu a autofagia induzida pelo cádmio	Yuan et al., 2016
A injeção de quercetina em tumor A549 de ratos, efetivamente reduziu o crescimento do câncer in vivo. A fosforilação de histona 3 diminuiu nos tecidos tumorais depois do tratamento com quercetina. Dessa forma a quercetina pode suprimir o crescimento celular de câncer de pulmão in vitro e <i>in vivo</i> .	Xingyu et al., 2016
Foi demonstrado que oxigenasse protege a função hepática contra a acrilamida na indução de danos aos DNA em ratos	Ansar et al., 2016
O tratamento com quercetina protege a contratilidade do tecido sanguíneo contra a injúria da isquemia aguda\reperfusão (I/R) por reduzir o estresse oxidativo e apoptose induzida pelo I/R	Tinay et al., 2017
Quercetina possui potencial aplicação clínica para o tratamento de glioblastoma por causa do dos seus efeitos inibitório na proliferação de células do glioblastoma e invasão	Liu et al., 2017
Quercetina inibe a resposta inflamatória mediada pela micróglia através da indução da heme oxigenasse -1, dessa forma protegendo contra a obesidade induzida pela infamação hipotalâmica.	Yang et al., 2017
Quercetina, quando usada em associação com diferentes níveis de pesticidas (5 mg\kg) ou suas misturas (10 mg\kg), previne o inchaço mitocondrial em tecidos cerebrais variados	Beghu et al., 2017
Através dos seus efeitos anti-inflamatórios, a quercetina reduz a dor neuropática pela inibição do caminho de sinalização do receptor <i>Toll-like</i>	Ji te al., 2017
Quercetina protege roedores do dano cognitivo funcional induzido pela d-galactose e apoptose neuronal induzida pelo caminho de sinalização Nrf2-ARE	Dong et al., 2017
Quercetina diminui a taxa de hiperalgesia causada pelo tamoxifeno na indução da adenomiose em roedores. O mecanismo de resposta é a redução da sensibilização central, o que pode uma terapia promissora para o tratamento de adenomiose	Nie; Liu, 2017
Quercetina possui efeito leishmanicida no estágio amastigota de <i>Leishmania donovani</i> e <i>L. amazonensis</i> , e reduz a carga parasitária de células do baço de hamster infectadas com <i>L. donovani</i>	Da Silva et al., 2011

Fonte: Produzida pelo autor, com base nos dados de (KIM; PARK, 2018; DA SILVA et al 2011).

Para além de seus efeitos no sequestro de radicais livres e de íons metálicos, a quercetina também exerce atividade antioxidante por induzir a atividade de enzimas como superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) no cérebro. Além disso, reduz significativamente a peroxidação lipídica no hipocampo e córtex pré-frontal de roedores, quando administrada em combinação com quetamina, em um modelo de esquizofrenia (MERT et al., 2019).

A quercetina exerce efeito antiviral e antitumoral por modular diferencialmente a expressão genes de interleucinas em células mononucleares periféricas (PBMC), favorecendo o perfil Th-1, que promove a imunidade celular pelo interferon gama (IFN- γ) e a diminuição do perfil Th-2 envolvido na imunidade humoral e ativação macrofágicas pela IL-4 (NAIR et al., 2002). Similarmente, o seu glicosídeo mais comum, a rutina, age em células de micróglia, no SNC promovendo uma redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (COSTA et al., 2016)

“Droga promíscua” foi o termo cunhado por Hampton (2015) em que se diz das capacidades de certas drogas em se ligar a múltiplos alvos e, assim, tem se comportado a quercetina no que tange as interações com múltiplas proteínas das leishmanias. A quercetina interage com múltiplos alvos nas leishmanias como as arginases, ribonucleotídeo redutases e topoisomerasas (DA SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012). A atividade antileishmania da quercetina foi observada em culturas de *L. amazonensis* e os mecanismos de ação propostos foram a disfunção mitocondrial e a geração de ROS (FONSECA-SILVA et al., 2011). Também, é verificado que além de exercer atividade antileishmania em formas amastigotas de *L. amazonensis*, a quercetina pareceu melhorar a infecção parasitária em modelos de roedores, sem exibir citotoxicidade tanto *in vitro* como *in vivo* (TASDEMIR et al., 2006).

A atividade antibacteriana da quercetina, ultimamente, tem sido investigada em detalhes, especificamente com relação à *Staphylococcus aureus* resistentes à meticiclina (MRSA) e bactérias multidroga resistentes (MDR) (HIRAI et al., 2010; SHARMA et al., 2019). Estudos com quercetina e seus análogos demonstraram inibição enzimática importante em enzimas como DNA-girase e topoisomerase IV, o que sugere o potencial dual de inibição desses compostos (HOSSION et al., 2011). Tanto a quercetina isolada de extrato

metanólico de *Alium cepa*, quanto o extrato bruto apresentaram atividade antibacteriana. O extrato bruto demonstrou ser mais potente contra *K. Pneumonia* MDRPA3, com um halo de inibição de 21mm, enquanto que a quercetina isolada foi mais potente contra *M. Smegmatis* cepa 994, como halo de inibição de 18 mm. O que demonstra que a quercetina, o principal composto do extrato, pode ser usada para o tratamento de infecções causadas por cepas bacterianas MDRs (SHARMA et al., 2019).

O potencial anticancerígeno da quercetina tem sido fortemente evidenciado, não apenas em estudos com a molécula padrão, mas também através de seus análogos naturais e dos seus compostos semi-sintéticos (CHATZIATHANASIADOU et al., 2018; DAJAS, 2012; MASSI et al., 2017; SAK, 2014). Em carcinoma hepatocelular, a quercetina inibiu o crescimento de células *in vitro* através de vários mecanismos de morte evidenciados como parada do ciclo celular, apoptose e promoção de autofagia (WU et al., 2019). Com o objetivo de avaliar os efeitos da quercetina em carcinoma hepatocelular, Zhao e colaboradores (2014) trataram células da linhagem HepG2 com 50 μ M de quercetina e 10 μ M de cisplatina e concluíram que a quercetina possui atividade supressora através da indução da parada do ciclo celular e apoptose. E, em combinação com a cisplatina, gerou um efeito sinérgico inibitório na supressão do crescimento celular e indução de apoptose (ZHAO; ZHAO; JIAO, 2014).

A quercetina e o glicosídeo rutina demonstraram suprimir o crescimento de células de glioblastomas pela inibição do metabolismo celular, migração e regulação da matriz protética extracelular e expressão de metaloproteinases (SANTOS et al., 2015). Mais além, esses flavonóides demonstraram atividade moduladora no perfil inflamatório de micróglia, e apresentaram atividade antiglioma em co-culturas de micróglia com células de glioma C6, oriundas de gliomas de ratos (DA SILVA et al., 2019). Também em células C6, a quercetina demonstrou atividade ambígua, por proteger essas células contra a peroxidação lipídica induzida pelo hidroperóxido de cumeno e, em contraposição induziu, nas mesmas concentrações, citotoxicidade (ZIELIŃSKA; GÜLDEN; SEIBERT, 2003). Mais recentemente evidenciou-se que a quercetina agiu em sinergismo com o butirato de sódio, inibindo os mecanismos autofágicos envolvidos com a proteção de glioblastomas, em células C6, e em células humanas T98G. Os autores evidenciaram um aumento significativo na taxa de apoptose,

demonstrando o potencial terapêutico do uso da quercetina em promover alternativas para o tratamento de glioblastomas resistentes a temozolamida (TAYLOR; KHATHAYER; RAY, 2019).

A quercetina é um bioflavonóide com múltiplas atividades anticancerígenas em vários tipos de tumores sólidos e, mais além, foi comprovado, ter atividade em células HL-60, oriundas de leucemia mieloide aguda (LMA), ao reduzir significativamente o crescimento tumoral através de indução do estresse oxidativo intratumoral, ativação do sinal ERK e subsequente apoptose (W.J. LEE; FANG, 2015) Em macrófagos da linhagem THP1, a quercetina reduziu a resposta pró-inflamatória reduzindo a expressão de IL-6 e TNF- α e reduziu a viabilidade celular para aproximadamente 60% em comparação ao controle, demonstrando que a quercetina, assim como o ácido salicílico, estão entre os mais significativos polifenóis com atividade anti-inflamatória positiva em populações macrofágicas humanas (DRUMMOND et al., 2013).

4.9 QUERCETINA - ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS

A quercetina possui identificação pela *International Union of Pure And Applied Chemistry* (IUPAC) como 2-(3,4-di-hidroxifenil) -3,5,7-tri-hidroxicromen-4-ona; sua fórmula molecular é $C_{15}H_{10}O_7$, tem peso molecular de 302.2357 g mol⁻¹ e possui alguns nomes triviais, como soporentina e melentina. Dentre as suas principais propriedades físicas, a quercetina é descrita como um pó amarelo, que se converte a forma anidra a 203-207 °F.; Densidade de 1,799 g/cm³; Ponto de Fusão de 316 °C; Solubilidade em água: 60 mg mL⁻¹ a 16 °C, menor que 1 mg mL⁻¹ a 70 °C. Muito solúvel em éter e metanol, solúvel em etanol, acetona, piridina, ácido acético e DMSO. Possui Pressão de Vapor de $2,81 \times 10^{-14}$ mmHg a 25 °C. Suas propriedades espectrais são: Absorção máxima: 256 nm (log E= 4.32); 301 nm (log E= 4.32); Número Sadtler Ref: 594 (IR, PRISM) (D'ANDREA, 2015).

4.10 QUERCETINA - ASPECTOS (BIO)FARMACOLÓGICOS

Devido à suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, a quercetina têm sido testadas para variadas aplicações terapêuticas, dentre as mais proeminentes, destacam-se: envelhecimento, artrite, asma, diabetes, alergias, resistência e proteção cardiovascular, anticâncer, antiobesidade, gastroproteção, adenocarcinoma de próstata, imunidade e infecção, desordens de humor e performance no exercício físico (D'ANDREA, 2015).

A quercetina e seus derivados podem promover um aumento das funções cardíacas, indicando a proposta do seu uso terapêutico no tratamento de doenças cardiovasculares. A quercetina exibe benefícios significantes relacionados com a saúde cardiovascular, como inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), inibição do efeito vasodilatador dependente do endotélio, redução de moléculas de adesão e outros marcadores inflamatórios, efeito protetor sobre o óxido nítrico na função endotelial sob condições de estresse oxidativo, prevenção de danos oxidativos e inflamatórios neuronais e efeitos antiagregantes plaquetários (PATEL et al., 2018).

Atuando em outros sistemas fisiológicos, a quercetina pode ser, terapeuticamente útil, na prevenção e controle de diferentes enfermidades. A patogenia de doenças neuronais como esquizofrenia é atribuída ao aumento do estresse oxidativo. Recentemente, Mert e colaboradores (2019) evidenciaram o efeito neuroprotetor da quercetina em diminuir o estresse oxidativo na esquizofrenia e assim, prevenir a destruição cognitiva que ocorre nessa doença (MERT et al., 2019). A quercetina, também, possui efeito neuroprotetor contra a isquemia cerebral induzida em ratos, diminuindo o edema cerebral e o volume do infarto na isquemia cerebral focal (PARK; SHAH; KOH, 2018).

Atualmente, Ebegboni e colaboradores (2019) relataram que a quercetina e seus metabólitos, isoladamente ou em combinação, desencadearam significativos efeitos protetores na linhagem celular de trofoblasto de primeiro trimestre humano contra o estresse oxidativo induzido pela hipóxia e reoxigenação (EBEGBONI et al., 2019). Estudos, também, foram publicados, comprovando a atividade da quercetina em inibir o crescimento de células cancerígenas, seja com o tratamento isolado ou em combinação com outros

agentes quimioterápicos (ANGST et al., 2013; BANERJEE et al., 2008; BRAGANHOL et al., 2006; PRADHAN et al., 2010).

4.11 QUERCETINA- ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS

A quercetina está amplamente presente na natureza, principalmente, na sua forma glicosídica. O intestino delgado é eficaz na absorção de glicosídeos de quercetina devido à atividade hidrolisante pertencente aos enterócitos, à atividade de enterobactérias e, ainda pela atividade enzimática de glicuronidação e sulfatação. Sendo assim, antes mesmo de atingir a circulação êntero-hepática e o fígado, a quercetina começa a sofrer conversão metabólica (MUROTA; TERAOKA, 2003).

Em um modelo farmacocinético, Chen e colaboradores (2005), observaram que depois de uma administração oral de quercetina em ratos, 93% foi metabolizada por células intestinais, antes mesmo de serem absorvidas, e apenas 3,1 % foi metabolizada no fígado, demonstrando a extensa metabolização extra-hepática da quercetina (CHEN et al., 2005). Ao alimentar ratos (500 mg Kg⁻¹ de quercetina) por 11 semanas, De Boer e colaboradores (2005) demonstraram que a quercetina e seus metabólitos estão amplamente distribuídos entre os diversos órgãos, sendo que o maior nível de quercetina é encontrado no pulmão e, os menores níveis no cérebro e no baço, demonstrando assim a capacidade desse composto em atravessar a barreira hematoencefálica (DE BOER et al., 2005).

Tang e colaboradores (2016) demonstraram que o ácido 3,4-di-hidroxifenilacético é o catabólito predominante e, biologicamente ativo, dos glicosídeos da quercetina (TANG et al., 2016). Suas evidências foram substantiadas por Mullen e colaboradores (2008) usando-se glicosídeos da quercetina radiomarcados, que são convertidos em ácidos fenólicos com propriedades biológicas, no trato gastrointestinal (TGI) de ratos (ALDWELL et al., 2008).

No estômago, em condições ácidas, a quercetina pode ser degradada a ácidos fenólicos por ação de bactérias na fissão do anel, levando à quebra do esqueleto da estrutura da quercetina e, posteriormente, esses ácidos fenólicos

também podem ser absorvidos pelo estômago (FARRELL et al., 2012). No intestino delgado existe uma extensiva glicuronidação da quercetina, pela ação da difosfo uridina glucuronosil transferases e intensa O-metilação pela ação da catecol-O-metiltransferase. Neste mesmo local do TGI, acontece também a liberação do glicosídeo da quercetina; a deglicosilação acontece mediada por enzimas beta glicosidase oriundas da microbiota (NÉMETH et al., 2003). Subsequentemente, a quercetina e seus derivados são transportados, através da veia porta ao fígado, onde sofrem metabolização como O-metilação, glicuronidação e sulfatação (MUROTA; NAKAMURA; UEHARA, 2018).

Segundo Nemeth (2003), a quercetina alcança o plasma depois de uma dieta rica em flavonóides; no entanto, os seus glicosídeos polifenólicos são relativamente hidrofílicos, e não se difundem passivamente através das membranas (NÉMETH et al., 2003). Para Paganga e Rice-Evans (1997), glicosídeos intactos da quercetina se acumulam no plasma sanguíneo depois de uma dieta rica em glicosídeos de quercetina (PAGANGA; RICE-EVANS, 1997). Porém, Moon (2000) demonstrou que não se tratava de glicosídeos de quercetina, mas sim, de metabólitos de quercetina que se acumulavam na circulação em dietas ricas em flavonóides (MOON et al., 2000).

De acordo com Nemeth e colaboradores (2003) a absorção de glicosídeos flavonóides na dieta em humanos envolve um passo crítico de deglicosilação, que é mediado por betaglicosidases epiteliais. Ainda, segundo estes autores, a variação significativa na atividade da betaglicosidase entre os indivíduos pode ser um fator determinante na variação da biodisponibilidade dos flavonóides (NÉMETH et al., 2003). Para Jacobasch e colaboradores (2003), a disponibilidade dos glicosídeos de quercetina depende da posição da ligação do açúcar e, assim, metabólitos da quercetina foram cinco vezes mais absorvidos do que, quando a quercetina foi administrada na forma quercetina-4'-O-glicosídeo, ao invés de quercetina-3-O-rutinosídeo e, além disso, o sítio de absorção para esses glicosídeos foram diferentes (JACOBASCH et al., 2003). Também, tem sido relatado, na literatura, que alguns desses flavonóides possuem atividade fisiológica mais evidente, do que os seus precursores glicosídeos de quercetina (LEE et al., 2016; MUROTA; NAKAMURA; UEHARA, 2018).

Experimentos usando quercetina-O-glicosídeo (Q4'G) radiomarcada demonstraram que a molécula atravessa o TGI de ratos, e quase toda Q4'G é convertida em ácidos fenólicos, sendo o 3,4 diidroxifenolacético (DOPAC) e 3-hidroxifenolacético os mais predominantes (PETERSEN et al., 2016). Tang e colaboradores (2016) demonstraram que o DOPAC é o ácido fenólico mais ativo derivado do catabolismo da quercetina, no que se refere às propriedades antioxidantes (TANG et al., 2016).

A absorção da quercetina e seus metabólitos conjugados continua no intestino grosso, onde microrganismos do cólon pode desassimilar esses compostos. Por exemplo, *Clostridium* pode causar fissão do anel C da quercetina e os metabólitos formados pela flora intestinal são absorvidos e transportados via veia porta, onde sofrem as reações de conjugação (WANG et al., 2016). Geralmente, nem a quercetina livre, nem seus glicosídeos são detectados no plasma, onde a quercetina existe apenas na forma conjugada (MASSI et al., 2017). Dessa forma, quercetina 3-O glicoronídeo, 3'-O-metil-quercetina (isohametina), isohametina 3-Oglicurónídeo, e quercetina 3-O-sulfato entram na corrente sanguínea (WANG et al., 2016).

Segundo Patersen (2016), a quercetina possui uma ampla variabilidade interindividual de biodisponibilidade e a concentração plasmática total de quercetina livre e conjugada varia na taxa de 72 e 193 nmol L⁻¹, após a ingestão em curto prazo de alimentos ricos em quercetina (PETERSEN et al., 2016; WANG et al., 2016). No entanto, de acordo com Dajas (2012), em um tratamento de curto prazo, a quercetina não é capaz de atingir o limiar de concentração plasmática eficaz, mas a suplementação de quercetina, em longo prazo, pode ser diferente (DAJAS, 2012).

Guo, Mah e Bruno (2014) evidenciaram que a ingestão diária de 1.095 mg de quercetina por 3 dias levou a uma concentração plasmática de 1.430 nmol L⁻¹ (GUO; MAH; BRUNO, 2014). No estudo de Petersen e colaboradores (2016), a suplementação de uma cápsula de 22 mg de quercetina resultou em uma concentração plasmática de quercetina equivalente a 109 nmol L⁻¹ (PETERSEN et al., 2016). Dessa forma, é interessante notar que existe uma grande variabilidade interindividual na absorção da quercetina. Interessante, também, é o fato de que os níveis plasmáticos de quercetina podem ser aumentados após a administração, em longo prazo (WANG et al., 2016). Isso pode ser, em parte

devido as altas doses administradas nos animais estudados, também pela saturação e alta demanda do sistema enzimático, e ou outros fatores como eliminação lenta, e acúmulo dos metabólitos (RANGEL-ORDÓÑEZ et al., 2010).

A quercetina e seus metabólitos podem ser excretados por via urinária, mas também podem ser excretados pela bile e eliminados nas fezes (NISHIJIMA et al., 2015; SHI; WILLIAMSON, 2015). A quercetina, também, pode sofrer metabolização por bactérias, pela quebra do anel e decomposição em ácidos fenólicos e CO₂, que foram excretados através das fezes e da respiração (GUO; BRUNO, 2015). Walle, Walle e Halushka (2001), em estudos com humanos, evidenciaram que a quercetina é eliminada na forma de conjugados glicuronídeos e sulfato via CO₂, urina e fezes. Para estes autores, o CO₂ é o maior metabólito da quercetina em humanos, perfazendo um total de 52,1%, o que demonstra extensa metabolização da molécula (WALLE; WALLE; HALUSHKA, 2001).

Embora a quercetina seja extensivamente metabolizada e dosada, principalmente, na forma de seus metabólitos, Moon e colaboradores (2000) desenvolveram estudos farmacocinéticos da quercetina em humanos e, demonstraram uma variação de 0,25 a 18mg de quercetina inalterada na urina após a ingestão de 500mg de quercetina, em indivíduos saudáveis (MOON et al., 2000). Ahmad e colaboradores (2007), também encontraram uma alta depuração oral de quercetina ($3,5 \times 10^4 \text{ L h}^{-1}$) com uma meia vida média de 3,5 horas (AHMAD, 2007).

Sabe-se que a quercetina é susceptível a muitas alterações químicas, como a oxidação durante o processamento e armazenamento. A estabilidade química da quercetina é influenciada pela concentração de oxigênio, pH, temperatura, concentração de outros antioxidantes, bem como a presença de íons metálicos (WANG et al., 2016).

No organismo, a quercetina pode ser oxidada em vários produtos de oxidação conhecidos como quercetinas-quinonas, que são altamente reativas com mercaptanos e podem reagir rapidamente com glutathione (GSH), o mercaptano endógeno mais abundante, gerando assim glutathione-quercetina (GSQ) (POCERNICH; BUTTERFIELD, 2012). Também, ficou evidenciado que GSQ é altamente instável podendo se dissociar e, dessa forma, em altas concentrações de GSH, a quercetina-quinona tende a formar GSQ. Por outro

lado, em baixas concentrações de GSH, a quercetina-quinona pode reagir com grupos sulfidrílica de outras proteínas (POCERNICH; BUTTERFIELD, 2012; WANG et al., 2016).

A quercetina pode reagir com íons metálicos para formar complexos quercetina-metal e, essa ligação pode alterar o potencial de oxidação da molécula. Assim, dependendo do metal ligado à quercetina, a atividade de sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) aumenta ou pode diminuir (DEHGHAN; KHOSHKAM, 2012). Sabe-se, também, que os íons metálicos se ligam com mais afinidade ao oxigênio da carbonila e à hidroxila do carbono 3 no anel C da quercetina, levando à diminuição da atividade antioxidante da molécula (PĘKAL; BIESAGA; PYRZYNSKA, 2011).

Recentemente, Tamura e colaboradores (2017) publicaram uma relação entre o metabolismo da quercetina fecal e a estrutura da comunidade microbiana intestinal, em indivíduos saudáveis e, verificaram que a rápida biotransformação da quercetina pela microbiota intestinal altera a biodisponibilidade da quercetina no intestino grosso. As bactérias intestinais metabolizam a maior parte da quercetina fornecida em 24 horas sob condições anaeróbias, apesar das variações interindividuais na composição da microbiota fecal (TAMURA et al., 2017).

Omar e colaboradores (2014) afirmaram que existem, ainda, novas informações a serem obtidas sobre a transformação química e biológica da quercetina. Em seus estudos, os autores encontraram 35 metabólitos da quercetina usando espectroscopia de massa de alta resolução, dos quais foram inclusos: glicuronídeos, sulfatos, metabólitos mistos de sulfato/glicuronídeo e versões metiladas desses metabólitos, além dos vários metabólitos formados a partir de produtos da degradação química da quercetina (OMAR et al., 2014). Diversos estudos revelaram que a quercetina é pouco absorvida, conjugada extensivamente e sua biodisponibilidade oral é baixa, associados com a baixa solubilidade em água (MULHOLLAND et al., 2001; WANG et al., 2016).

4.12 QUERCETINA - ASPECTOS FARMACODINÂMICOS

A quercetina possui vários mecanismos de ação já demonstrados para as diversas atividades propostas, além da eliminação direta de radicais livres, outros mecanismos antioxidantes contribuem para a ação potente da quercetina contra o estresse oxidativo, como a inibição de enzimas, incluindo xantina oxidase e óxido nítrico sintase bem como outros mecanismos bioquímicos, como a quelação de ferro e cálcio e a inibição da peroxidação lipídica (DAJAS, 2012). Mais além, demonstra-se que a mitocôndria é a principal organela celular beneficiada pelas ações da quercetina, e assim tem sido estudada por seu efeito mitocondriotrópico (MATTAREI et al., 2010). Assim a quercetina age como protetor nas funções deste componente celular, o que pode ser explicado pela acumulação mitocondrial do flavonóide na organela (COSTA et al., 2016; FIORANI et al., 2010).

Esse potencial efeito protetor da quercetina, para condições envolvendo disfunção mitocondrial e associado com estresse oxidativo no cérebro, é a base do potencial terapêutico da quercetina. De fato, na Doença de Parkinson um defeito no complexo mitocondrial tem sido identificado como possível causa de degeneração neuronal e indução de apoptose pela abertura do poro de transição mitocondrial e liberação de citocromo C (DAJAS, 2012; OLANOW; TATTON, 1999).

Em adição aos efeitos antioxidantes da mitocôndria em sequestrar radicais livres, outros mecanismos contribuem para o potencial da quercetina na mitocôndria contra o estresse oxidativo, como inibição de enzimas, incluindo a xantina oxidase e a oxido nítrico sintase. Além disso, outros mecanismos como quelação do ferro e cálcio e a inibição da peroxidação lipídica foram discutidos na literatura (DAJAS, 2012).

Lee e colaboradores (2014) evidenciaram que a proteína de extrusão multidroga e compostos tóxicos (MATE1) é um transportador de membrana para flavonóides com alta afinidade pela quercetina. Os autores avaliaram o acúmulo intracelular da quercetina em células com super expressão desses receptores e, também, o desaparecimento desse efeito frente a inibidores de da proteína MATE1 e do silenciamento do gene da MATE1 (LEE et al., 2014).

High-mobility group box protein 1 (HMGB1) é um grupo de proteínas altamente preservadas, são secretadas pela ação de macrófagos previamente ativados e possuem um papel crucial na formação da imunidade tardia. A

proteínas HMGB1 que se encontram fora da célula podem motivar a liberação de do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 β e outros mediadores inflamatórios. A quercetina inibe a estimulação de HMGB1, o que sugere o seu poder em modular a sinalização celular através da ação de citocinas pró-inflamatórias (KHAN et al., 2016).

A ativação de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) é um importante caminho de sinalização induzido por HMGB1 na expressão genes pró-inflamatórios. HMGB1 induz a liberação de citocinas que estão potencialmente relacionadas com a inflamação através do caminho MAPK. Lipopolissacarídeos ou HMGB1 induzem a fosforilação de quinase c-Jun N-terminal envolvidas no desencadeamento da apoptose em células somáticas e a sinalização extracelular regulada por quinase em macrófagos. A quercetina inibiu consideravelmente HMGB1 e LPS na indução da fosforilação da quinase c-Jun N-terminal, reduzindo a expressão de fatores pró-inflamatórios (DEGRYSE et al., 2001; KHAN et al., 2016).

A via de sinalização JAC/STAT é um típico caminho de transdução de sinais para vários tipos de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento. A ligação aos seus receptores leva a ativação de JAC, o que aumenta o processo de fosforilação que leva a ativação de STAT. As STAT's ativadas entram no núcleo, onde exercem a sua ação através da regulação da expressão de genes. A quercetina possui a habilidade de inibir a ativação de JAK-STAT em várias desordens inflamatórias e, desse modo o tratamento de células T ativadas com quercetina inibiu a fosforilação de JACK 2, tirosina kinase 2 (TRK2), STAT3 e STAT4 o que resultou na diminuição dos níveis de propagação de células T e variação para o fenótipo Th1 (MUTHIAN; BRIGHT, 2004).

Segundo Park (2018) a quercetina inibe a apoptose através de mecanismos antiapoptóticos baseados na via PI3K/Akt na isquemia cerebral focal. A Poli ADP ribose polimerase (PARP) e a caspase-3 são proteínas associadas à apoptose que ativam os fatores de fragmentação do DNA e causam clivagem do DNA e, portanto, são usadas como indicadores de apoptose. A ativação de PARP e caspase-3 induz a processos apoptóticos através de uma via apoptótica mediada por mitocôndrias. Park, Shah e Koh (2018) observaram o efeito atenuante da quercetina sobre ratos com isquemia cerebral focal

induzida e a diminuição na expressão de PARP e caspase-3 nos indivíduos que foram tratados com quercetina (PARK; SHAH; KOH, 2018).

4.13 QUERCETINA - MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS

Uma abordagem interessante para superar a baixa biodisponibilidade de polifenóis, a fim de testar e explorar sua atividade *in vivo*, depende da modificação química do composto natural, que visa em aumentar a solubilidade e retardar o metabolismo. Dessa forma, muitas rotas sintéticas estão sendo estudadas como a adição de aminas e brominação, a modificação em oximas e a complexação com hidrazinas (FOTI; ROCCO, 2014; HELGREN et al., 2015; ÖZYÜREK et al., 2014). Esforços estão, obviamente, concentrados na proteção dos hidroxilos polifenóis. Outra possibilidade é a modificação da molécula pela introdução de um substituinte estável capaz de conferir propriedades desejáveis. Sob esse ponto de vista, a esterificação é um ponto de partida para a obtenção de moléculas com aplicações farmacológicas melhoradas (MATTAREI et al., 2010).

Diversas reações químicas de modificação da quercetina foram descritas, com o intuito fundamental de tornar a molécula mais apolar, facilitando sua absorção entre as membranas e a proteção dos seus grupos hidroxila e a melhora da biodisponibilidade (DANIHELOVÁ et al., 2013; ENAYAT et al., 2016; HIRPARA et al., 2012; KIM et al., 2015). Para superar as limitações da quercetina em solubilizar-se, um programa de síntese química foi realizado e a pró-droga modificada da quercetina, o (QC12), foi a droga mais promissora a chegar em estudos clínicos (LIAO et al., 2015; MULHOLLAND et al., 2001). Também, é conhecida a atividade melhorada da quercetina estruturalmente modificada sobre a inibição da trombina, atividade antimutagênica e anticancerígena (AZUMA et al., 2011; WANG et al., 2012).

Veverka e colaboradores (2015) sintetizaram co-cristais de quercetina e verificaram uma melhor estabilidade, melhora da atividade antioxidante, melhor atividade inibitória de protease, melhor efeito inibidor da protrombina e, aproximadamente, duas vezes melhor atividade citotóxica em células humanas de câncer cervical e câncer de cólon (VEVERKA et al., 2015).

Gonçalves e colaboradores (2019) obtiveram bons resultados ao utilizar o derivado tetra etil-éter quercetina, incorporado a uma nanoemulsão, o que resultou em um componente promissor com propriedades melhoradas para a penetração na pele e incorporação em formulações contendo protetores solares (GONÇALVES et al., 2019). Dessa forma, a modificação química da quercetina supera várias barreiras na entrega da substância, como a baixa solubilidade, absorção oral insuficiente e o rápido metabolismo pré-sistêmico (VEVERKA et al., 2015).

Kim e colaboradores (2015) sintetizaram uma série de alquil-éter derivados de quercetina e caracterizaram suas propriedades físicas, além de medirem a atividade antibacteriana e antioxidante desses compostos (KIM et al., 2015). Os autores sintetizaram éteres derivados de quercetina, de acordo com a reação de síntese de Williamson, na qual se reagiu quercetina com um haleto de alquila correspondente na presença de K_2CO_3 . Ainda, segundo Kim e colaboradores (2015), esses derivados são mais estáveis à oxidação e mais hidrofóbicos (KIM et al., 2015). Danihelová e colaboradores (2013) avaliaram a atividade de 15 novos compostos acil derivados da quercetina e encontraram uma melhor atividade citotóxica contra células cancerígenas de câncer cervical (HeLa), sugerindo que uma lipofilização apropriada da molécula de quercetina pode melhorar a ação dessa molécula, por melhorar a sua biodisponibilidade (DANIHELOVÁ et al., 2013).

Hisanaga e colaboradores (2016) avaliaram os efeitos da quercetina prenilada (PQ) e encontraram que o composto foi mais eficiente na inibição da produção da enzima induzível óxido nítrico síntese (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2) além de 12 tipos de citocinas (HISANAGA et al., 2016). A prenilação aumentou o efeito inibitório da quercetina sobre a fosforilação da proteína quinase ativada pelo estresse-1 (SEK1), quinase jun-N-terminal (JNK1/2), quinase MAPK/ERK (MEK1/2) e quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2) induzida por lipopolissacarídeos em macrófagos de ratos, o que demonstrou mais interação da quercetina prenilada com SEK1 e MEK 1, do que a quercetina ao inibir a atividade dessas quinases (MUKAI, 2018).

Liao e colaboradores (2015) investigaram o efeito antitumoral de dois novos derivados alquilados de quercetina, o 7-O-butilquercetina e o 7-O-

geranilquercetina, em células cancerígenas de pulmão. Demonstraram que os compostos sintetizados foram mais tóxicos para as células cancerígenas e com melhor capacidade de acumulação nas células comparados com a quercetina (LIAO et al., 2015). Hauser e colaboradores (2013) sintetizou um híbrido derivado da quercetina e do fármaco antituberculose isoniazida, o CBNQS, como potencial composto atenuador de metal-proteína (MPAC) (NICOLÁS; REY; HAUSER-DAVIS, 2013).

Uma revisão bibliográfica sobre o progresso da pesquisa na modificação estrutural da quercetina para gerar agentes anticancerígenos foi publicada por Massi e colaboradores (2017). Estes autores organizaram os tipos de modificação química da quercetina que, atualmente estão sendo foco de pesquisas em manipulação dos grupos hidroxila fenólicos, como modificações no carbono C4 do resíduo carbonila, funcionalização dos anéis A e B da quercetina e complexação da molécula com metais (MASSI et al., 2017). Dessa forma, fica evidente que as diversas formas de reações químicas de modificação da quercetina, descritas na literatura, têm o intuito de viabilizar a molécula para uso medicinal.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo é do tipo quantitativo, analítico e experimental. Experimentos foram realizados nos Laboratórios dos Departamentos de Ciências da Vida (DCV) e Ciências Exatas e da Terra (DCET), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), em parceria com os Laboratórios de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq), alocados no Instituto de Ciências da Saúde (ICS), da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI), do Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz.

5.1 MATERIAIS DE CONSUMO

5.1.1 REAGENTES E VIDRARIAS

Todos os reagentes foram de grau analítico e comercialmente disponíveis. A maioria dos reagentes foram obtidos diretamente dos fornecedores Merck® e Sigma Aldrich® (quercetina, piridina, anidrido acético, ácido tricoloroisocianurico, diclorometano, 2,4 – dinitro-fenilhidrazina, cloridrato de hidroxilamina, acetato de sódio, éter de petróleo, ácido sulfúrico, nitrato de potássio).

Todas os materiais e vidrarias (béqueres, balões volumétricos, erlenmeyers, pipetas graduadas e volumétricas, funil de separação, pinças, placa para Cromatografia em camada delgada (CCD) de alumínio revestidas de sílica Gel, tubos capilares de vidro, vidros de relógio, sistema de refluxo, placas de Petri 35mm, microplacas de 96 poços, dentre outros) foram utilizados diretamente das embalagens e/ou descontaminados, lavados em água destilada e secos a temperatura ambiente

5.2 MATERIAIS PERMANENTES

5.2.1 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados neste estudo foram: Balança de precisão (Urano UA 220/0,0001), evaporador rotativo (modelo QUIMIS Q344M), placa de agitação magnética e aquecimento (NOVA NI 1103), refrigerador (Consul CRD37EB), freezer horizontal (Consul CHB53), medidor de ponto de fusão (MARCONI MA380), espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) - (100S PerkinElmer), espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis (HEXIS DR3900), espectrofotômetro (DubesserLab), Spectrômetro Bruker Avance III 500 MHz NMR.

5.3 SÍNTESE DO DERIVADO QUERCETINA PENTAACETATO (Q5)

Tentativas de rotas reacionais descritas na literatura foram adaptadas, porém, em sua maioria, recuperou-se o reagente no meio reacional. As rotas reacionais descritas para molécula da quercetina apresentaram os meios viáveis e reprodutíveis (Figura 2). Além disso, também foram selecionadas as reações que apresentaram maior rendimento e menor quantidade de reagentes químicos ou nocivos. O programa utilizado para visualizar as estruturas foi o Marvin® sketch 14.4.20 (CHEMAXON, 2015, <http://www.chemaxon.com/>).

A mistura contendo a quercetina (300 mg, 1 eq.), anidrido acético (0.80 mL, 20 eq.) e piridina (7.5 mL) foi mantida em agitação magnética à temperatura ambiente (Figura 2). Após 24 horas de agitação, foram adicionados 250 mL de diclorometano ao meio reacional. Em seguida, a reação foi lavada com HCl a 10% (3×100 mL), NaOH diluído (3×50 mL) e água (3×100 mL), seca pelo sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada no rota evaporador (MATTAREI et al., 2010).

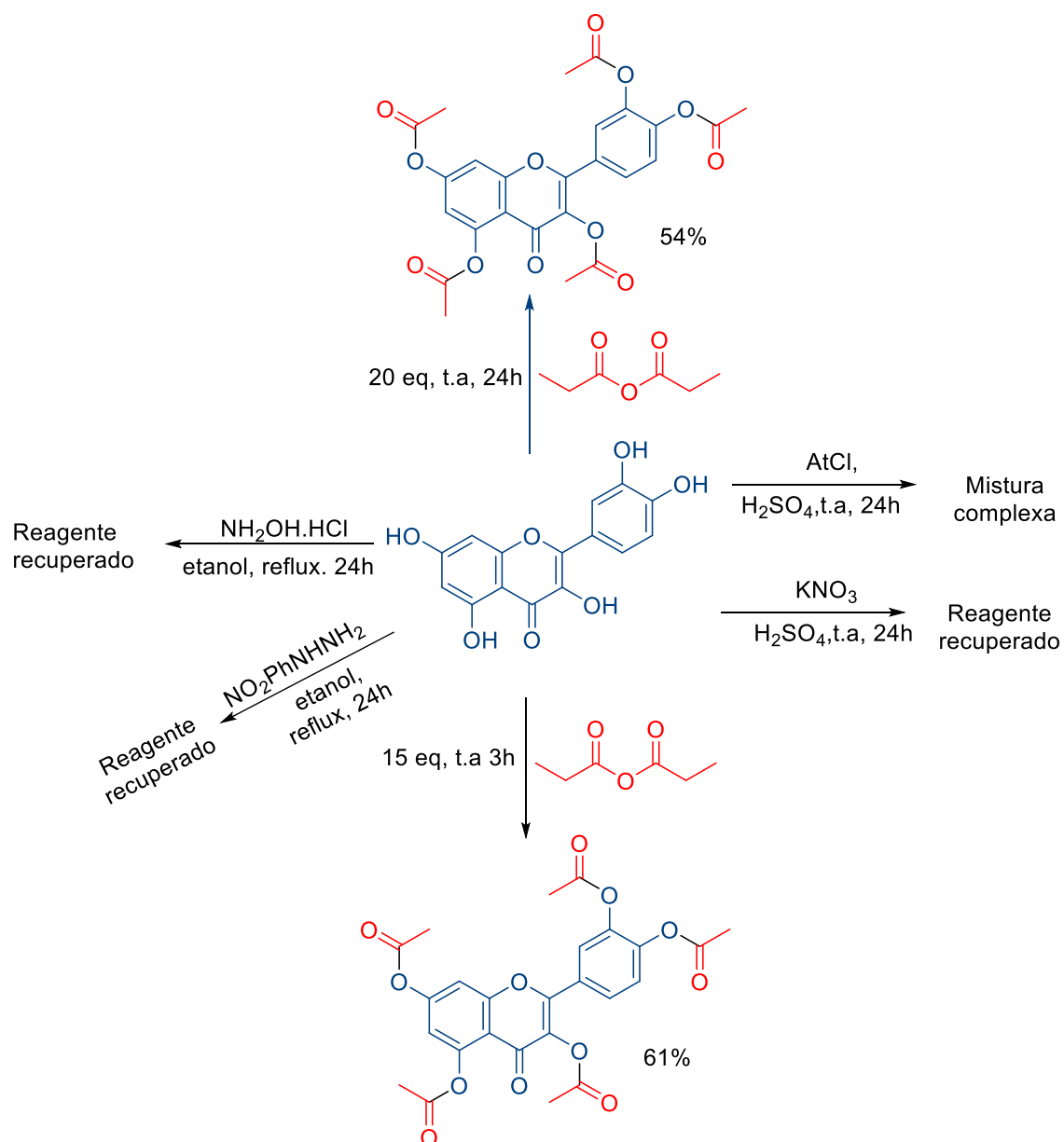


Figura 2. Tentativas de rotas reacionais descritas para a quercetina.

5.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA QUERCETINA PENTAACETATO

A reação de modificação estrutural da molécula de quercetina foi monitorada por cromatografia de camada delgada (CCD). Para a caracterização físico-química, foi utilizado o ponto de fusão. Para os testes de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), pelo método de Reflexão total atenuada (ATR), usou-se um Espectrômetro FTIR, com obtenção dos espectros de

varredura no infravermelho médio (4000 a 600 cm^{-1}). A amostra (massa ~ 5,0 mg) foi acondicionada sobre o cristal de ATR e submetida a uma pressão de aproximadamente 20 N, com o auxílio de uma prensa mecânica manual. Os espectros de FTIR foram traçados pelo software OriginPro 8, OriginLAB® (www.originlab.com). Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos em parceria com o Laboratório de Ressonância Magnética (LabRMN), da Universidade Federal de Goiás (UFG), e registrados em espectrômetro (500 MHz para RNM de ^1H e 125 MHz para RNM de ^{13}C , usando como solvente o DMSO. Os desvios químicos foram expressos na escala de ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e o clorofórmio (CHCl_3) foi usado como referência interna. Os espectros de RMN foram processados pelo software TopSpin®, 4.1.3 (www.bruker.com).

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] - ABTS^{•+}

A atividade de sequestro do ABTS^{•+} foi adaptada do método descrito por Dorman e Hiltunen (2004). Persulfato de potássio e ABTS (Sigma Aldrich – SP Brasil), foram dissolvidos em água destilada para formar uma concentração final de 2,45 mM e 7 mM, respectivamente. A solução de ABTS^{•+} foi produzida pela adição de ambas as soluções na taxa de 1:1 e depois, incubada à temperatura ambiente, por 16 horas no escuro. A solução resultante, de coloração intensamente azulada, foi ajustada com etanol, no espectrofotômetro, para uma absorvância de $0,7 \pm 0,05$ nm, a 734 nm antes do uso. Alíquotas de 30 μL das amostras ou do 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico - Trolox (Sigma Aldrich – SP Brasil), usado como padrão de referência em diferentes concentrações (5, 10, 25, 50, 75 e 100 μM), foram adicionados a 3 mL da solução de ABTS^{•+} e aguardou-se reagir por 6 minutos. A absorvância foi medida a 734 nm contra um branco (etanol). A capacidade de sequestro do ABTS^{•+} foi calculada de acordo com a equação I:

$$\text{Efeito de sequestro do ABTS}^+ (\%) = (1 - A_0/A_1) \times 100 \quad (\text{Equação I})$$

Onde A_0 é a absorvância do controle; A_1 é a absorvância da amostra ou padrão. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Os valores de CI_{50} foram calculados e expressos como média $\pm$ DP, em μM .

5.6 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.6.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA)

Os microrganismos utilizados no teste foram obtidos através do Laboratório de Bioensaio do DCET - Campus I, da UNEB. Para as atividades antibacterianas foram utilizadas linhagens padrão de bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6833) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). A atividade fungicida foi testada em cepas de *Candida albicans*. As atividades antimicrobianas foram avaliadas pelo método de microdiluição em caldo, com base no documento M7 – A6 (NCCLS, 2002).

Todas as cepas bacterianas foram mantidas em caldo nutriente (NA, Himedia) e incubadas a 37 ° C por 24 horas. A espécie *Candida albicans* foi cultivada em caldo de levedura (Acumedia® Michigan), extrato de malte e glicose a 26°C por 72 horas. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 100 µL da solução estoque da Quercetina (Q) e Quercetina – pentaacetato (Q5) e das soluções dos controles para a primeira linha da placa de microtitulação (Tabela 3). Estas soluções foram diluídas em série (diluições duas vezes) com caldo nutriente e o caldo de levedura. Finalmente, 100 µL de uma suspensão padrão da bactéria e do fungo (ajustada para 0,5 McFarland, aproximadamente 10⁸ UFC mL⁻¹) foram adicionados em cada poço. Todas as placas de microtitulação foram incubadas a 37 ° C por 24 h para as bactérias e a 26°C por 72 horas para o fungo. Os valores de concentração inibitória mínima (MIC) foram determinados como a concentração mais baixa que inibiu visualmente o crescimento de bactérias. A diluição dos compostos foi realizada em DMSO 20% (400 µg mL⁻¹) e água 80% (v v⁻¹). A concentração de DMSO no ensaio final não excedeu 5%.

As concentrações finais dos compostos foram testadas, variando de 0,78 a 100 µg mL⁻¹. A concentração final dos microrganismos utilizados neste experimento foi de 9 × 10⁵ células mL⁻¹. Cada amostra foi testada em triplicata. Os agentes antimicrobianos benzilpenicilia e garamicia foram usados como controle positivo no ensaio antimicrobiano, e o Ciclopirox olamina como controle positivo para o ensaio fungicida. Após a microdiluição do caldo, 10 µL das

amostra dos poços foram subcultivados em placas de ágar nutriente e incubados a 37 ° C por 24 h para a determinação da concentração bactericida mínima (MBC), para a concentração fungicida mínima (MFC) definida em agar como capaz de matar a colônia de bactérias nas placas (ARAÚJO et al., 2017).

Tabela 3. Concentração dos controles para ensaio de atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica)

Controles	Concentração da solução estoque ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração máxima utilizada no experimento ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Benzilpenicilina	100	25
Garamicina	20	5
Ciclopirox olamina	100	25

5.6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

Promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (1×10^6 por poço) foram cultivadas em placa de 96 poços em meio Schneider (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS; GIBCO) e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina (Life, Carlsbad, CA) e submetidas ao tratamento com diferentes concentrações (100 μM ; 50 μM ; 25 μM ; 12,5 μM ; 6,25; 3,12 μM e 1,56 μM) do Q5. Os parasitos foram incubados por 72h a 26°C. Em seguida, 20 μL /poço de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) foram adicionados durante 2 horas. O Alamar Blue (resazurina) é um indicador que produz uma mudança colorimétrica e um sinal fluorescente em resposta à atividade metabólica. A resazurina é reduzida em resorufina por células metabolicamente ativas, desse modo, o corante age como aceptor intermediário de elétrons na cadeia de transporte de elétrons, sem interferir na transferência normal de elétrons. Sendo assim, o alamar blue pode ser reduzido, na mitocôndria por NAPH, FADH, FMNH, assim como pelos citocromos (RAMBERSAD, 2012). A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). A redução do resazurina em resorufina reflete a viabilidade celular (AHMED et al., 1994).

A leitura foi realizada no espectrofotômetro usando os comprimentos de onda de 570 e 600 nm. O cálculo de inibição da cultura axênica foi determinado baseado no controle não tratado (GUEDES et al., 2018).

5.6.3 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

5.6.3.1 SUBSTÂNCIAS

A dexametasona foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Para todos os ensaios os compostos foram solubilizados primeiramente em dimetilsulfóxido (DMSO; PanReac, Barcelona, Espanha) e, posteriormente, em meio de cultura, não excedendo a concentração final de 0,1% de DMSO nos testes.

5.6.3.2 ANIMAIS

Camundongos da linhagem BALB/c, com idade entre 4-10 semanas, foram fornecidos pelo biotério do Instituto Gonçalo Moniz (IGM, Salvador, Bahia, Brasil) onde ficaram mantidos em gaiolas contendo no máximo 5 camundongos. Todas as gaiolas foram mantidas em sala climatizada a $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum* durante todo o período experimental. Os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Uso Animal do Instituto Gonçalo Moniz/FIOCRUZ-BA (IGM-018/15).

5.6.3.3 CULTURA DE MACRÓFAGOS

Macrófagos do exsudato peritoneal (2×10^5 células/poço) foram incubados em placas de 96 poços, em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de SBF e 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, em triplicata, estimulados ou não com LPS (500 ng mL^{-1}) e IFN- γ (5 ng mL^{-1}), e tratados ou não com diferentes concentrações dos compostos quercetina e

quercetina – pentaacetato (20, 40 e 80 μM). As células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO_2 , durante 4 e 24 horas. Após esse período, os sobrenadantes das culturas foram coletados para dosagem de citocinas e de óxido nítrico.

5.6.3.4 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos testados foi utilizado o método colorimétrico do Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA). Sendo assim, o sobrenadante foi substituído por meio acrescido de 10% de de Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA) e as placas foram incubadas por mais 4 h. A leitura no espectrofotômetro foi realizada a 570 e 600 nm.

5.6.3.5 DOSAGEM DE TNF

A dosagem de TNF foi realizada a partir do sobrenadante das culturas de células, pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando kits DuoSet ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Placas de ELISA (NUNC – IMMUNO PLATE Maxisorp Surface) foram sensibilizadas com 50 μL /poço do anticorpo de captura, na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$, diluído em PBS 1x e incubadas por 16 horas à 4° C. As placas foram lavadas três vezes com PBS 1x / Tween 20 a 0,05% e bloqueadas com 100 μL /poço de PBS 1x e tween 20 a 0,05%, 0,1% de albumina bovina por 2 horas. Em seguida, foram adicionados 50 μL /poço das amostras, do branco e da curva padrão dos recombinantes diluídos no tampão Tris-salina (20 mM triz na base e 150 mM de NaCl) contendo 0,1% de albumina bovina e 0,05% de tween 20, durante 2 horas, à temperatura ambiente. O padrão foi diluído seriadamente (1:2), a partir da concentração inicial de 2000 pg/mL, com 11 diluições em duplicata. A placa foi lavada três vezes com PBS/tween 0,05% e incubada com 50 μL do anticorpo de detecção (biotinilado) na concentração de 400 ng/mL por um período de 2 horas. A placa foi lavada três vezes com PBS/tween 0,05% e incubada durante 20 minutos com avidina-peroxidase diluída 1:200. A revelação foi realizada adicionando o substrato TMB (Thermo

Fisher) e interrompida com ácido fosfórico a 0,05 M. A leitura da reação foi determinada utilizando o espectrofotômetro (Spectramax), com filtro de 450nm. As análises foram realizadas utilizando o Software Softmax 4.3.1.

5.6.3.6 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

A produção de oxido nítrico em sobrenadante de macrófagos foi estimada através da quantificação de seu produto oxidativo, o nitrito, pelo método de Griess (GREEN et al., 1982). A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Spectramax), com filtro de 570 nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1. e os resultados foram expressos em μM de nitrito, tendo por base uma curva padrão de nitrito de sódio com concentração inicial de 400 μM .

5.6.4 ATIVIDADE ANTICÂNCER

5.6.4.1 SUBSTÂNCIAS

O cloridrato de doxorrubicina foi obtido a partir do Laboratório IMA S.A.I.C. (Buenos Aires, Argentina). Para todos os ensaios os compostos foram solubilizados primeiramente em dimetilsulfóxido (DMSO; PanReac, Barcelona, Espanha) e posteriormente em meio de cultura, não excedendo a concentração final de 0,1% de DMSO nos testes.

5.6.4.2 CÉLULAS

HL-60 (leucemia promielocítica aguda humana) e HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), obtidas da American Type Culture Collection - ATCC (Rockville, Maryland, U.S.A.), foram utilizadas. Para avaliar a seletividade da quercetina e do derivado penta acetilado sobre a proliferação de células não cancerígenas, a linhagem MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano), também obtida da ATCC, foi utilizada. As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL) utilizando o meio

de cultura RPMI 1640 (Gibco™) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco™) e 50 µg mL⁻¹ de gentamicina (Gibco™). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C e acompanhadas diariamente. Todas as linhagens celulares foram testadas para micoplasma usando um kit de detecção de micoplasma por coloração com Hoechst (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), e todas as células estavam isentas de qualquer contaminação.

As células C6 de glioma C6 de rato foram cultivadas até a confluência em placas de poliestireno (TPP, Trasadingen, Suíça), conforme descrito anteriormente por (SANTOS et al., 2015) em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Cultilab, Campinas, Brasil) suplementado com 100 UI mL⁻¹ de penicilina G, 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina, 7 mmol L⁻¹ de glicose, 2 mmol / l de L-glutamina, 0,011 g L⁻¹ ácido pirúvico e soro fetal de vitela a 10% (FCS). As culturas foram mantidas em atmosfera umidificada composta de 95% de ar e 5% de CO₂ a 37 ° C.

5.6.4.3 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA

As células foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade pré-definida de 0,3 x 10⁶ células/mL para células da linhagem HL-60 e 0,7 x 10⁵ células/mL para células da linhagem HEPG2 e MRC-5. As moléculas foram adicionadas em uma série de 8 concentrações (80 a 0,62 µM), com exceção da doxorrubicina, que foi utilizada em concentrações variando de 0,003 a 5 µM. O controle negativo recebeu a mesma quantidade do DMSO (0,025%). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, foram adicionados 20 µL/poço de Alamar Blue e as placas foram incubadas por mais 4 h. A leitura das placas foi feita no espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA), nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

Devido aos diferentes protocolos utilizados e já validados entre os diferentes laboratórios parceiros, a viabilidade celular de C6 foi mensurada através do método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium (MTT, 1 mg mL⁻¹, Thermo Fisher), que se baseia na eficácia das células viáveis de metabolizar o anel de tetrazólio, um substrato de cor

amarelo, em cristais de formazan, de cor púrpura, através das desidrogenases mitocondriais. As células C6 foram distribuídas em placas de 96 poços na densidade de 1×10^4 células/poço. Os compostos foram adicionados em 7 concentrações (50 a 0,39 μM). Após 24, 48 e 72 horas dos tratamentos, as culturas celulares semeadas em placas de 96 poços foram incubadas com a solução de MTT a 37 °C e 5% de CO_2 por 2 h. Em seguida, as células foram lisadas com a adição do tampão de lise (dodecil sulfato de sódio (SDS) e dimetilformamida (DMF) e a placa foi incubada a temperatura ambiente por 18 h. A mensuração foi realizada em espectrofotômetro Varioskan Flash (Thermo Scientific, EUA) em comprimento de onda de 560 nm.

Destaca-se que as diferenças metodológicas entre os ensaios, se deu por conta de protocolos já estabelecidos para a avaliação das atividades citotóxicas, nas diferentes linhagens celulares, entre os diferentes laboratórios, que colaboraram com a realização desse estudo.

As observações morfológicas foram feitas em microscópio ótico (Nikon Instruments Inc., Americas) e fotografadas usando uma câmera digital (Nikon Instruments Inc., Americas). O programa photoscape x 4.1.1 (www.photoscape.org), foi utilizado para a formatação das imagens.

5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni para determinar a significância estatística das comparações entre os grupos nos estudos. Os estudos foram realizados em triplicata. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO ANÁLOGO QUERCETINA PENTAACETATO (Q5)

Para a síntese do análogo, quercetina 3, 3', 4', 5, 7 – penta acetato, foi utilizada a abordagem da acetilação total, a partir de adaptações das condições experimentais descritas na literatura por Mattarei e colaboradores (2010). Dessa forma, usou-se o anidrido acético como agente acilante e a piridina como catalisador. O rendimento obtido na reação foi de 54%. O produto obtido foi um sólido amarelado, com ponto de fusão na faixa de 178 – 186 °C. Adicionalmente, a análise comparativa do FTIR entre a quercetina padrão e o produto Q5, demonstrou ausência de bandas de absorção em 3400 cm^{-1} , características das hidroxilas da quercetina: IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3096, 1657, 1610, 1581, 1546, 1505, 1470, 1435, , 1435, 1312, 1230, 1166, 1090, 996, 932, 886, 839, 792, 675, 634; (Figura 3), e o surgimento de bandas em torno de 1600-1650 cm^{-1} , indicativas de carbonila de éster, demonstrando a substituição dos grupos hidroxila por grupos acetil: IR (KBr) ν (cm^{-1}): 1761, 1652, 1615, 1505, 1442, 1377, 1208, 1176, 1121, 1085, 1012, 892, 837, 691, 600. (figura 4). Os espectros foram compatíveis com os descritos na literatura para a quercetina e para o análogo quercetina pentaacetato (Q5) (MATTAREI et al., 2010).

QUERCETINA

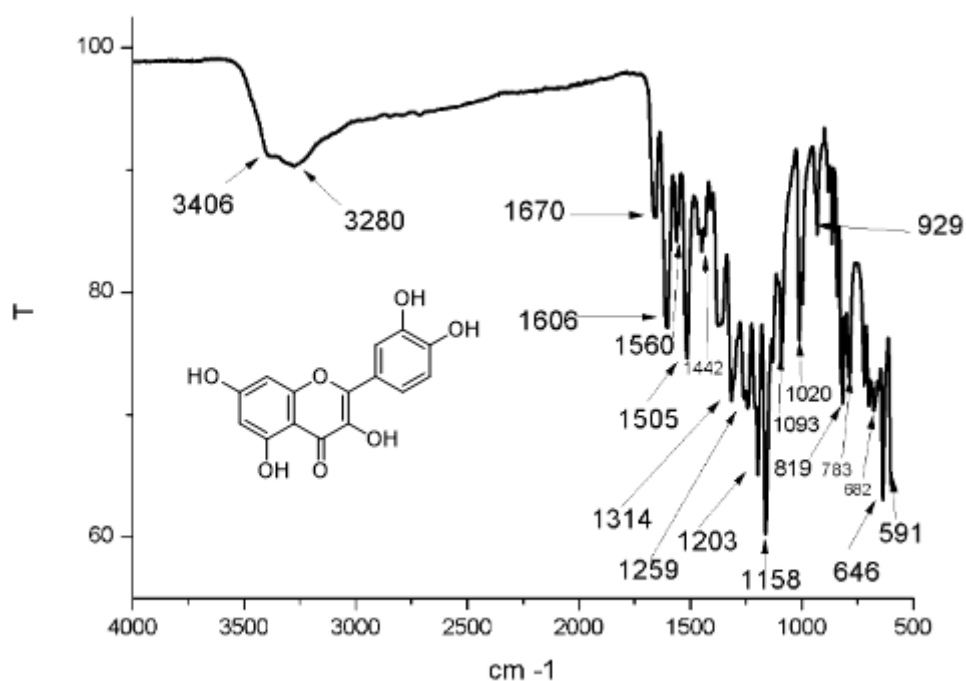


Figura 3. Espectro de infravermelho da Quercetina padrão

Q5

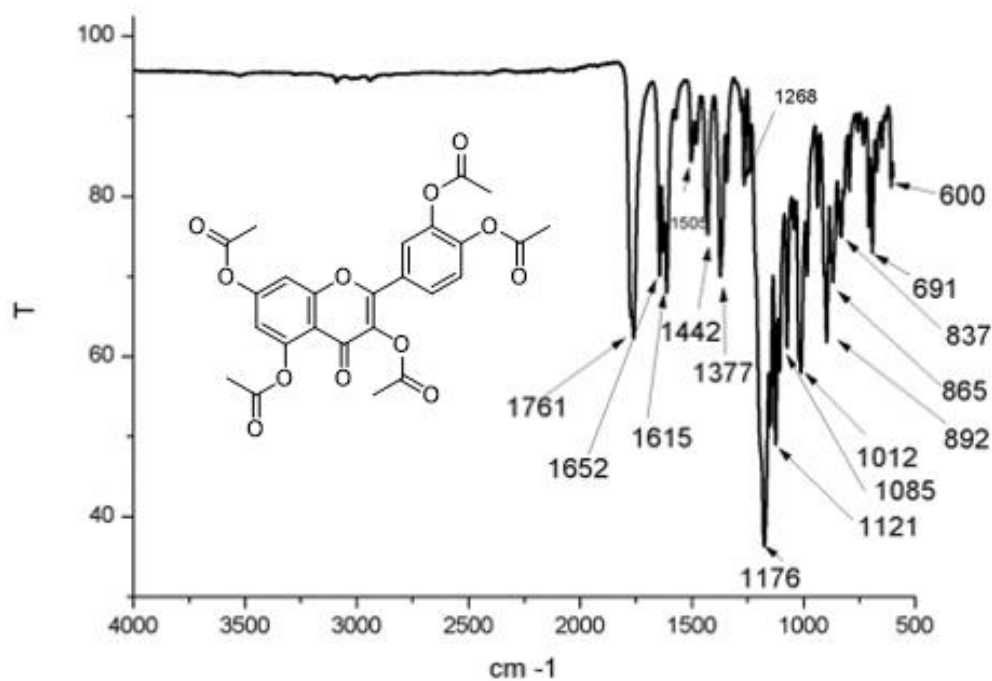


Figura 4. Espectro infravermelho do produto obtido, o análogo quercetina 3, 3', 4', 5, 7 – penta acetato (Q5)

6.1.1 ANÁLISE POR RMN ^1H E ^{13}C

As análises da RMN ^1H comprovaram o esqueleto estrutural da molécula da quercetina com cinco sinais singletos na faixa mais alta do espectro, correspondentes aos cinco hidrogênios ligados às hidroxilas (Figuras 5). Destaca-se o sinal característico do hidrogênio da hidroxila mais eletronegativa, ligada ao carbono 5, correspondente à região de aproximadamente 12,48 ppm do espectro (Figura 6), e as regiões intermediárias do espectro entre 6 e 8 ppm, correspondentes aos singletos e dupletos de hidrogênios aromáticos, característicos da quercetina; **^1H RMN (500MHz, DMSO- D_6):** 12,48 (1H, s, 5-OH); 9,56 (1H, s, 5-OH); 9,32 (1H, s, 4'-OH); 9,28 (1H, s, 3-OH); 7,68 (1H, brd, $J= 2,5$ Hz); 7,54 (1H, dd, $J= 10,5$ Hz, $J= 8,5$ Hz ou 6,90 (2H, brd, $J=8,5$ Hz) ; 6,41 (1H, brd, $J= 2$ Hz); 6,19 (1H, brd, $J= 2,5$ Hz).

64 rob 9 dmso.1.fid
PROTON DMSO {C:\dados\ufba\nmr} rmn 7

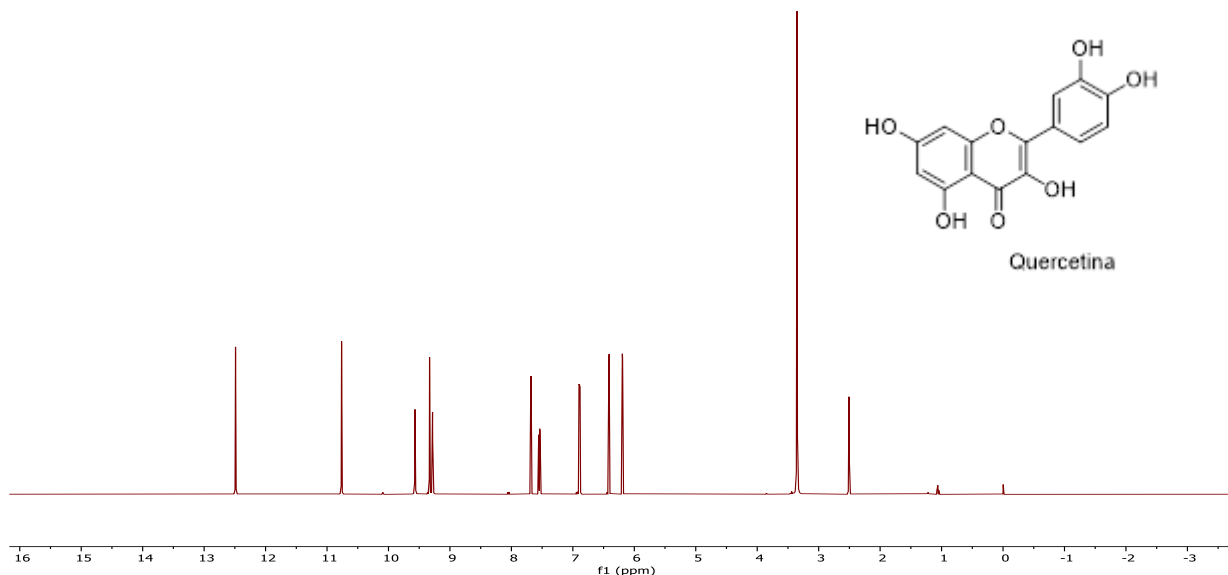


Figura 5. Espectro de RMN ^1H da quercetina

64 rob 9 dmso.1.fid
 PROTON DMSO {C:\dados\ufba\nmr} rmn 7

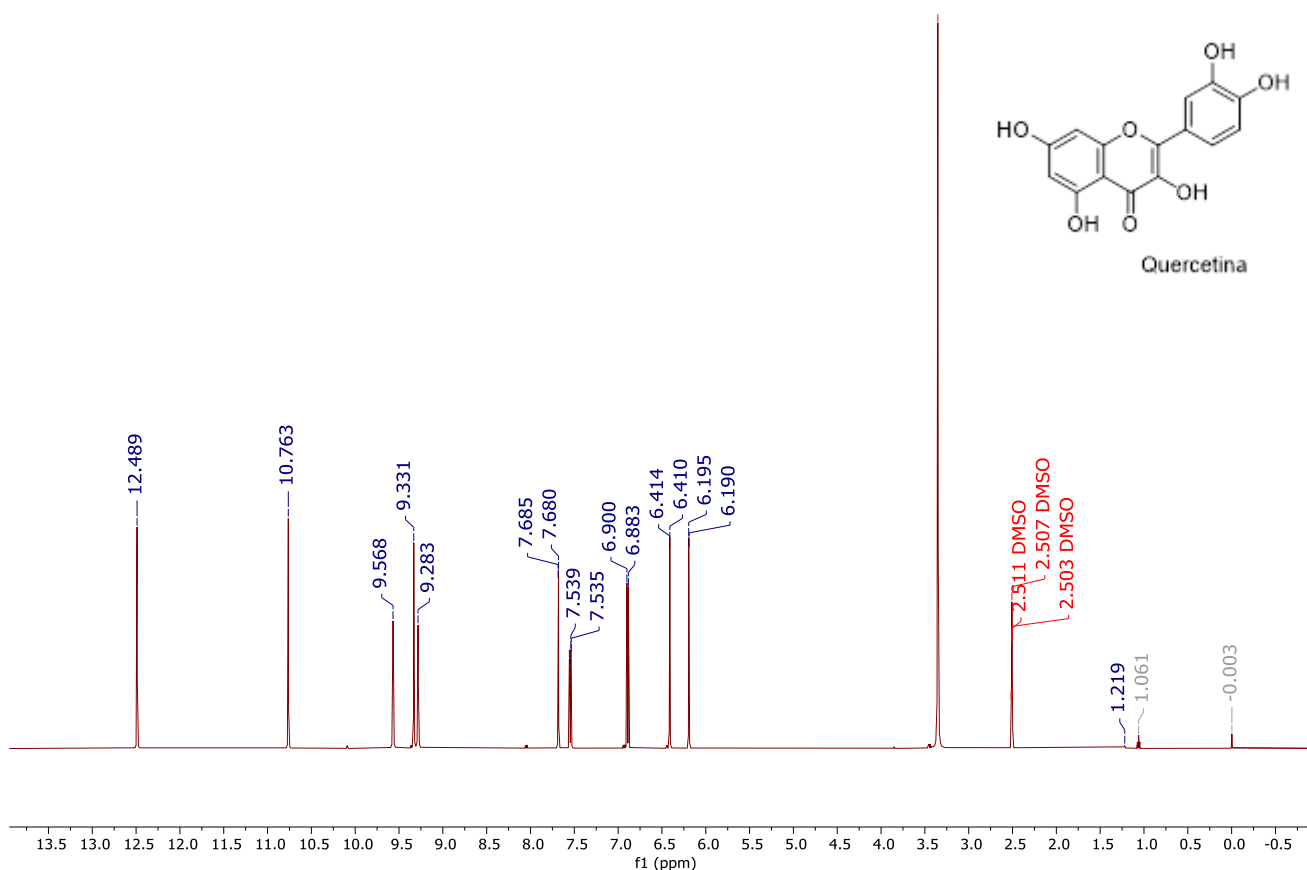


Figura 6. Expansão do espectro de RMN ^1H da quercetina

O espectro de RMN ^{13}C evidenciou o carbono da carbonila, característico dos flavonóis, com sinal no espectro em 175,81 ppm, e o restante dos carbonos com sinais correspondentes a faixa de carbonos aromáticos do espectro, característica da quercetina, além da ausência de carbonos na região menor do espectro, provenientes de carbonos alifáticos (Figura 7): **^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- D_6)** δ 175.81, 163.85, 160.69, 156.11, 147.67, 146.78, 145.03, 135.69, 121.93, 119.94, 115.57, 115.04, 102.99, 98.15 e 93.32.

64 rob 9 dms0.2.fid
carbono DMSO {C:\dados\ufba\nmr} rmn 7

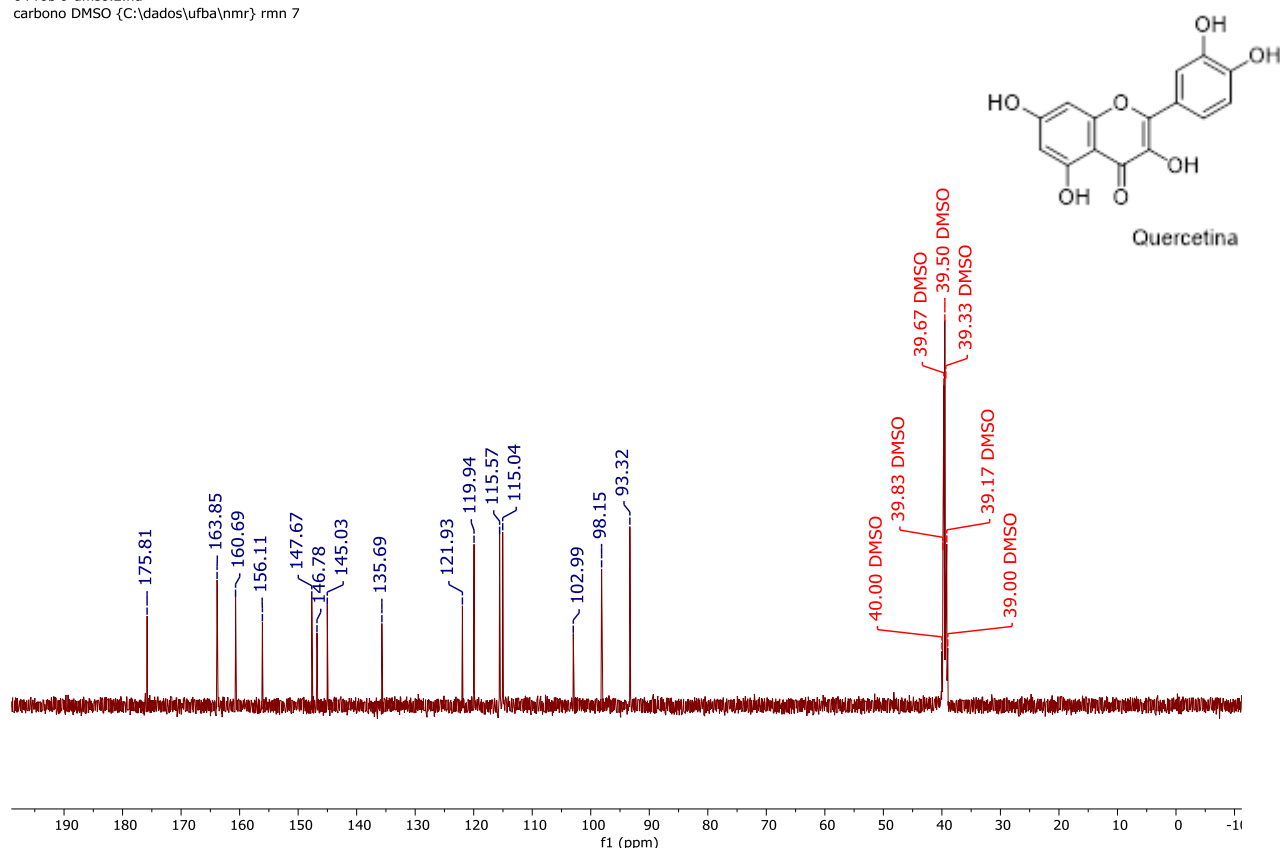
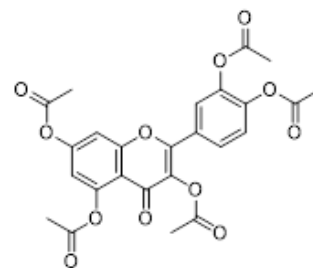


Figura 7. Espectro completo de RMN ^{13}C da quercetina

Para o composto obtido (Q5), as análises dos espectros de RMN ^1H apresentaram um padrão que evidenciou se tratar do análogo quercetina pentaacetato (Figura 8). Os sinais do produto obtido demonstraram acetilação total, com o desaparecimento dos singletos característicos das hidroxilas acima de 9 ppm no espectro de RMN ^1H , e o surgimento de sinais grandes e característicos das metilas nas regiões alifáticas do espectro, entre 2 e 3 ppm (Figuras 9 e 10). Para o espectro de RMN ^{13}C , o produto obtido demonstrou aumento dos sinais representativos das carbonilas de éster próximos a 170 ppm e o surgimento de sinais entre 20 e 21 ppm correspondentes aos deslocamentos químicos dos cinco carbonos alifáticos das metilas, verificados através da integral dos sinais (Figuras 11, 12 e 13) ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 2,341 (6 H, s, -OCOCH₃) ; 2,347 (3 H, s, -OCOCH₃) ; 2,352 (3 H, s, -OCOCH₃) ; 2,440 (3 H, s, -OCOCH₃) ; 6,884 (1 H, d, $J = 2,5$ Hz); 7,342 (1 H, d, $J = 2,0$ Hz); 7,360 (1 H, d, $J = 8,5$); 7,70 (1 H, d, $J = 2,0$ Hz); 7,73 (1H, dd, $J_1 = 8,5$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz). ^{13}C NMR (126 MHz,

CDCl₃) δ 170.04, 169.24, 167.86, 167.79, 156.87, 154.28, 150.43, 144.40, 142.22, 127.78, 126.42, 124.01, 123.93, 123.85, 113.89, 108.96, 21.16, 21.02, 20.65, 20.49.

61 rob 4.1.fid
PROTON CDCl3 {C:\dados\ufba\nmr} rmn 12



Quercetina pentaacetato

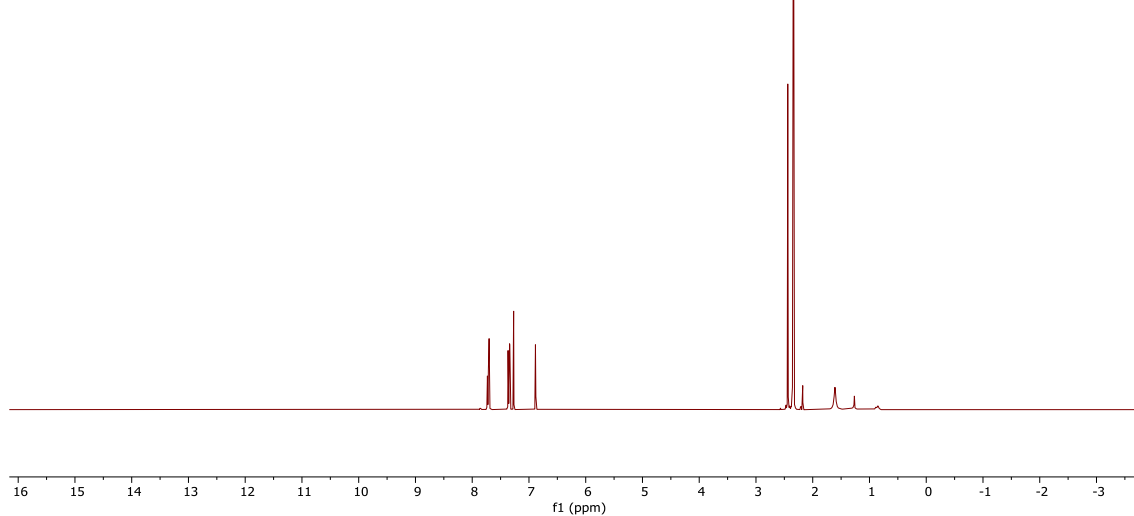


Figura 8. Espectro completo RMN ¹H do composto obtido, o análogo quercetina pentaacetato (Q5)

61 rob 4.1.fid
PROTON CDCl3 {C:\dados\ufba\nmr} rmn 12

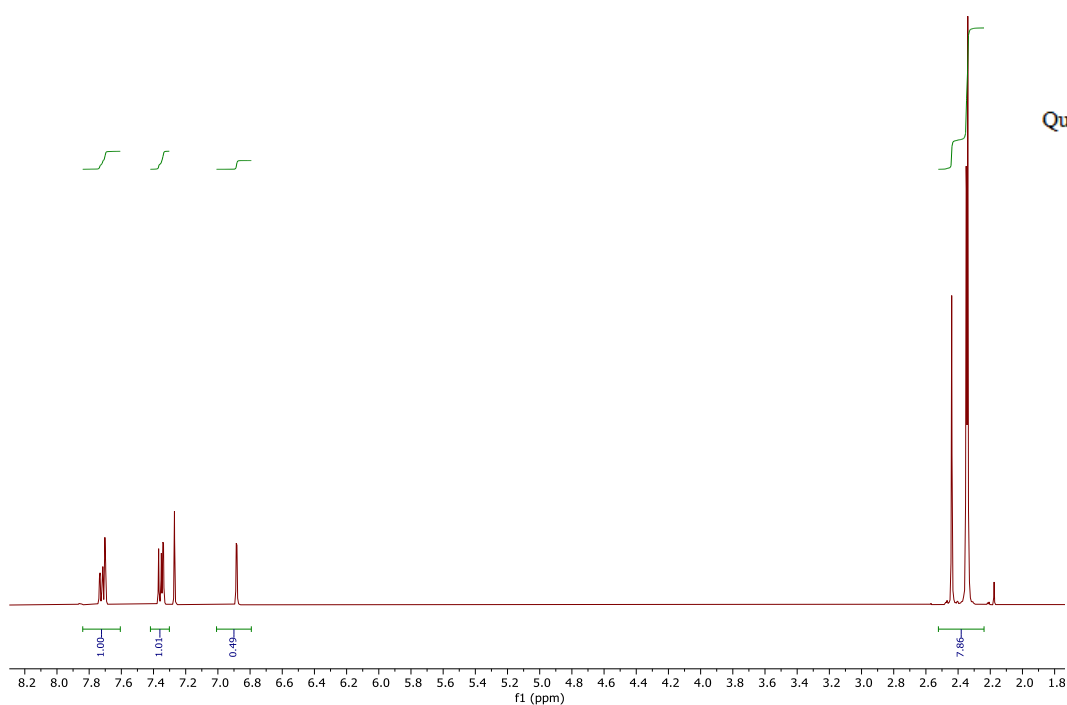


Figura 9. Expansão do espectro RMN ^1H do composto obtido, o análogo quercetina pentaacetato (Q5)

61 rob 4.1.fid
PROTON CDCl3 {C:\dados\ufba\nmr} rmn 12

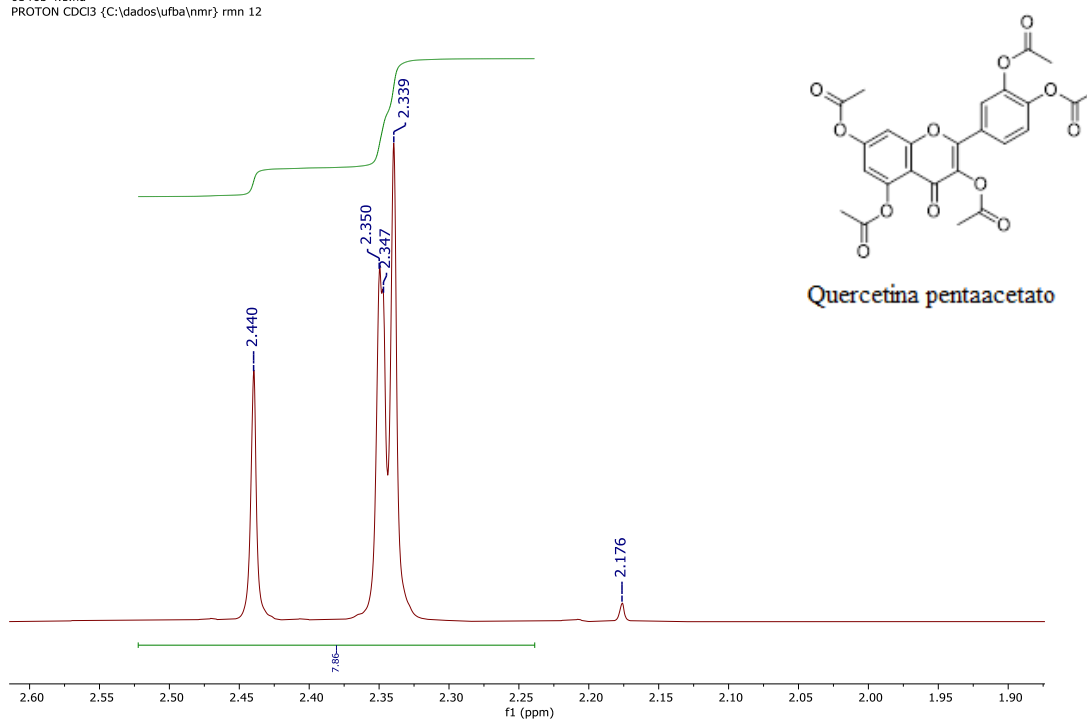
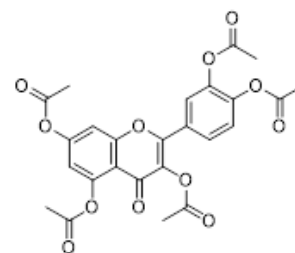


Figura 10. Expansão da região mais alifática do espectro da RMN ^1H do análogo obtido, o análogo quercetina pentaacetato (Q5)

61 rob 4.2.fid
carbono CDCl₃ {C:\dados\ufba\nmr} rmn 12



Quercetina pentaacetato

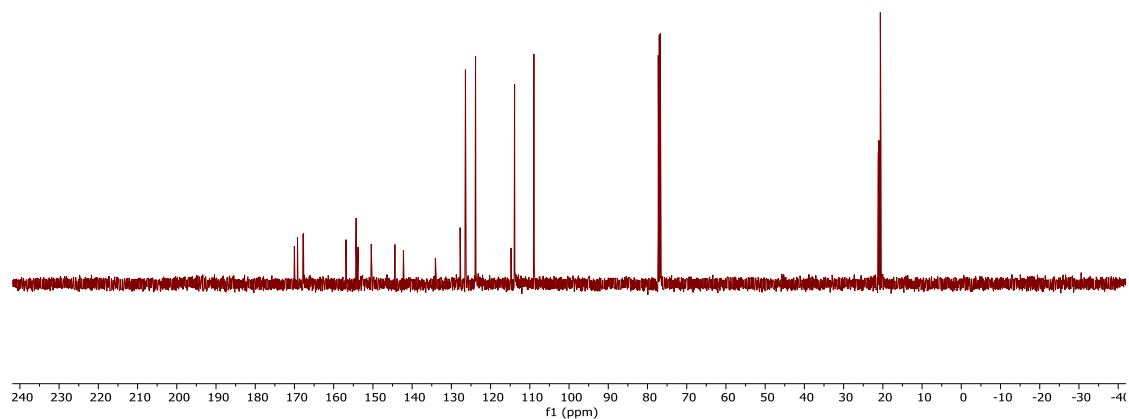
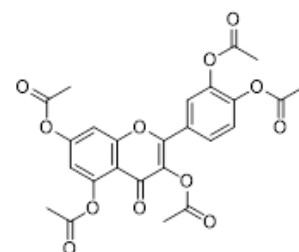


Figura 11. Espectro completo de RMN ¹³C do produto obtido, o análogo quercetina pentaacetato (Q5)

61 rob 4.2.fid
carbono CDCl₃ {C:\dados\ufba\nmr} rmn 12



Quercetina pentaacetato

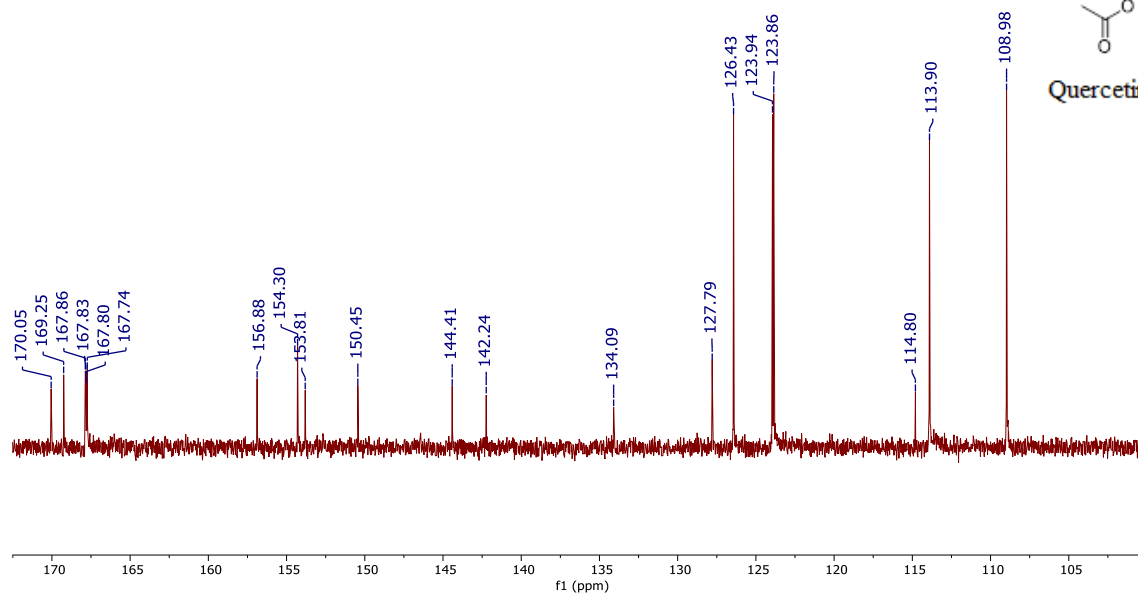


Figura 12. Expansão do espectro de RMN ¹³C do composto obtido, o análogo quercetina pentaacetato (Q5)

61 rob 4.2.fid
carbono CDCl₃ {C:\dados\ufba\nmr} rmn 12

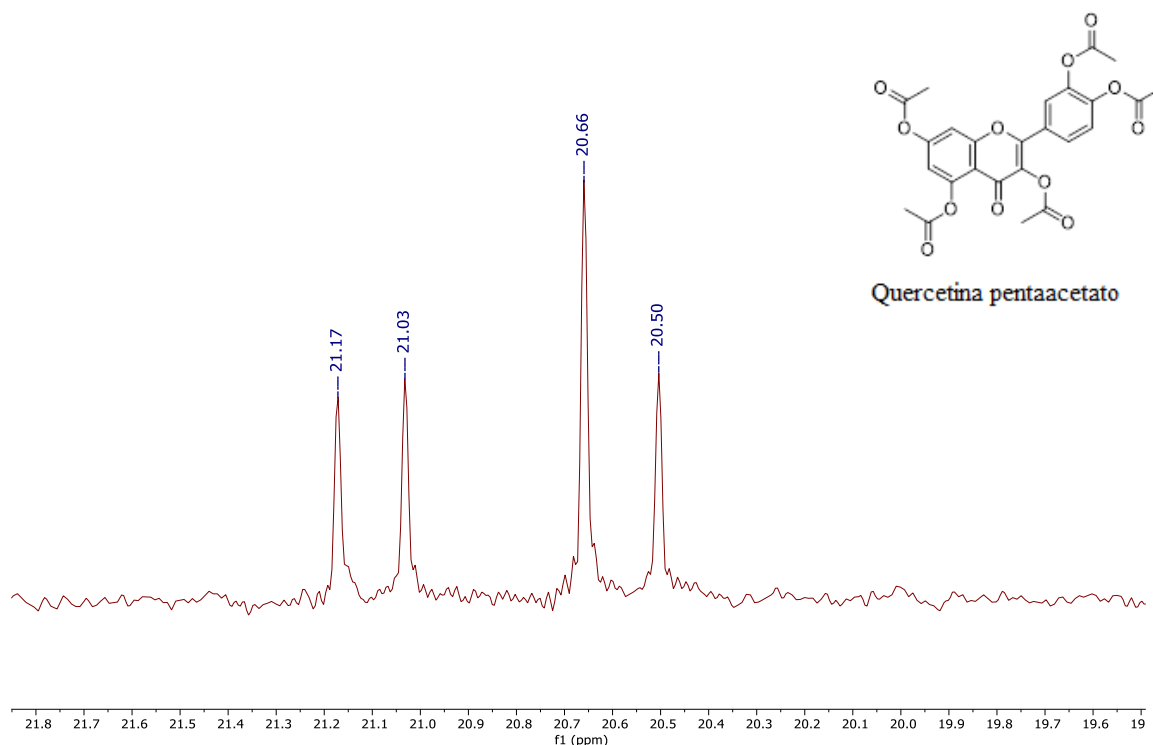


Figura 13. Expansão da região alifática do espectro de RMN ¹³C do análogo obtido, o análogo quercetina pentaacetato (Q5)

Biasutto e colaboradores (2007) foram os pioneiros na investigação de precursores baseados em ésteres com o intuito de aumentar biodisponibilidade da quercetina. Baseados em seus trabalhos, Mattarei e colaboradores, (2010) promoveram a acetilação total da quercetina e obtiveram o derivado Q5 em alto rendimento (79 -97%) (MATTAREI et al., 2010). Mais recentemente, Maryan e colaboradores (2019), obtiveram um rendimento de 85% na obtenção do análogo Q5 sob aquecimento (180 °C por 6 horas) (MARYAM MOHAJERI, LOTFOLLAH SAGHAEI et al., 2019). De modo geral, observa-se que a reação de acetilação da quercetina gera um bom rendimento. As diferenças aqui observadas, podem ser explicadas pelas adaptações das condições reacionais, reagentes e equipamentos utilizados por cada grupo de pesquisa.

6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A análise comparativa da atividade antioxidante da Q e do Q5 demonstrou que a quercetina foi mais ativa em sequestrar o radical ABTS^{•+} do que Q5 (29% e 18%, respectivamente), apresentado valores de IC₅₀ (em μM) de $188,850 \pm 0,003$ para a quercetina (Q) e $379,560 \pm 0,004$ para o análogo quercetina pentaacetato (Q5), respectivamente (Figura 14).

A atividade antioxidante dos flavonóides está diretamente relacionada à sua estrutura molecular. Existem dois mecanismos através dos quais compostos fenólicos podem exercer suas funções antioxidantes: transferência de átomos de hidrogênio e doação de elétrons (DEHGHAN; KHOSHKAM, 2012). A quercetina pura (Q) demonstrou um pouco mais de atividade, quando comparada com Q5. A superior atividade antioxidante da quercetina pode ser atribuída à contribuição significativa das hidroxilas, e seus hidrogênios, que são substituídos por acetilas em Q5, dessa forma, diminuindo a capacidade para a doação de hidrogênios ou de sequestro de radicais livres pela molécula da quercetina.

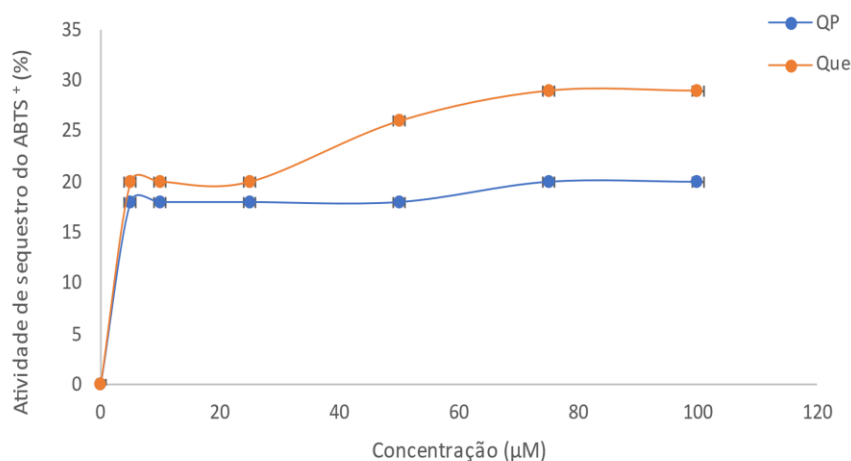


Figura 14. Atividade de sequestro do radical ABTS^{•+} pela Quercetina e análogo obtido, o análogo quercetina pentaacetato (Q5). Experimentos foram realizados em triplicatas e foram expressos através da média $\pm$ DP

As - *Staphylococcus aureus*; **Bs** - *Bacillus subtilis*; **Pa** - *Pseudomonas aeruginosa*; **Ca** - *Candida albicans*; **NA** - Não ativo na maior concentração testada. Controles positivos utilizados nos ensaios: Benzilpenicilina, para as bactérias Gram positivas (Sa e Bs), Garamicina, para a bactéria Gram negativa (Pa), Ciclopirox olamina para *C. albicans* (Ca).

Os resultados obtidos para a quercetina (Q) estão de acordo com o encontrado por Aquino e colaboradores (2016), que evidenciaram uma MIC $\geq 1024 \mu\text{g mL}^{-1}$, corroborando as atividades inibitórias irrelevantes frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (AQUINO et al., 2016). A quercetina também não demonstrou atividade antifúngica quando testada em linhagens padrão de *C. albicans* (ATCC 40227) (AQUINO et al., 2016). Além de não demonstrar resultados satisfatórios frente a outras cepas de *Candida* (ALVES et al., 2014).

Quanto aos resultados demonstrados pelo análogo quercetina pentaacetato (Q5) frente às culturas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, assim como do fungo *Candida albicans*, nenhum dado foi encontrado na literatura. O que demonstra o ineditismo desses resultados, ainda que, as atividades inibitórias demonstraram inatividade frente as culturas testadas (Tabela 4).

Alguns autores mencionaram que a quercetina pode demonstrar discrepâncias de resultados em testes de atividade antibacteriana devido a fatores como a utilização de diferentes cepas bacterianas, bem como da metodologia utilizada (DE CAMARGO; GONÇALVES RADDI, 2010; MENDES et al., 2021). Sendo assim, tais resultados em si não são desanimadores, haja visto que outros testes podem ser realizados, como a atividade moduladora para verificar o efeito sinérgico ou antagônico das amostras, quando associadas a antibióticos em cepas resistentes a múltiplos fármacos (AQUINO et al., 2016). Em adição, futuramente podem ser realizados ensaios para a avaliação da modulação de fatores de virulência bacterianos, já que os compostos não interferem na viabilidade celular (RIBEIRO et al., 2020). Mais além, sabendo-se que flavonóides podem exercer efeitos benéficos regulando o metabolismo da microbiota intestinal, e que a microbiota intestinal pode ter um importante papel na patogênese de doenças metabólicas (LU; XIAO; ZHANG, 2013), é de grande relevância, verificar as atividades de Q e Q5 em secretomas, assim como em bactérias benéficas da microbiota intestinal.

6.4 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

Para avaliar a atividade do composto frente às formas promastigotas das duas espécies de *Leishmania*, o valor da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) foi calculado a partir do ensaio de viabilidade celular em cultura axênica. Para a *Leishmania braziliensis*, o análogo Q5 apresentou valores de CI₅₀ superiores a 100 µM. Como esperado, a anfotericina B, fármaco de referência utilizada no ensaio, apresentou baixos valores de CI₅₀ (1,1 µM ± 0,1). Também, foi avaliado o efeito de Q5 sobre as formas promastigotas de *L. amazonenses* e, este composto exibiu menor valor de CI₅₀ (75,1 ± 4,7 µM) para esta espécie em comparação a *L. braziliensis*, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Atividade anti-leishmania, frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*, da Quercetina (Q) e do análogo quercetina pentaacetato (Q5).

Compostos	CI ₅₀ (µM) <i>L. amazonenses</i>	CI ₅₀ (µM) <i>L. braziliensis</i>
Quercetina (Q)	>100,00	>100,00
Q5	75,10 ± 4,70	>100,00
Anfotericina B	0,99 ± 0,02	1,10 ± 0,10

Valores representam a média ± desvio padrão calculados a partir de três experimentos independentes.
CI₅₀= concentração inibitória de 50%.

Em estudos realizados comparando as atividades antitripanossoma e antileishmania de flavonoides e seus análogos (derivados da quercetina) foram considerados agentes antiprotozoários potentes e efetivos contra formas amastigotas de *L. donovani* (CI₅₀ = 1,0 µg mL⁻¹) (TASDEMIR et al., 2006). Para formas promastigotas de *L. amazonensis*, Fonseca e Silva et al. (2011), encontraram valores de CI₅₀ = 31,4 µM, em culturas tratadas com quercetina, em 48 horas, e uma parada total no crescimento celular com 96 µM de quercetina

em 96 horas, o que demonstrou uma boa atividade antileishmanicida da quercetina *contra L. amazonenses* (FONSECA-SILVA et al., 2011).

O contraste dos dados da literatura com os achados deste estudo, pode estar relacionados por diferenças de formulações e/ou da metodologia empregada. Cataneo e colaboradores (2019), utilizam até 192 μM para avaliar o efeito antipromastigota da quercetina frente a *L. brasiliensis*, o que pode sinalizar para um aumento nas concentrações usadas, haja vista a baixa toxicidade da molécula e do seu análogo, frente a células peritoneais de macrófagos (CATANEO et al., 2019). O análogo quercetina penta-acetato demonstrou uma melhor atividade (CI_{50} = 75,1 μM) quando comparada com a quercetina (CI_{50} não observada). Tal melhora no efeito, pode ser considerada, em perspectiva da melhor absorção empregada da molécula modificada. Em culturas promastigotas de *L. major*, o composto quercetina e seu análogo quercetina-pentaacetato demonstraram efeito concentração dependente, com valores de CI_{50} de $2,5 \pm 0,92$ μM para a quercetina e $2,85 \pm 0,99$ μM para o composto quercetina-pentaacetato, respectivamente (MARYAM MOHAJERI, LOTFOLLAH SAGHAEI et al., 2019), pouco contrastando com o resultado aqui encontrado.

Alguns autores demonstraram que a quercetina induz a morte em promastigotas de *L. amazonensis* através da disfunção da membrana mitocondrial resultante da produção de ROS (CATANEO et al., 2019; FONSECA-SILVA et al., 2011). Outros autores identificaram alvos para a quercetina, no tratamento das leishmanioses, como arginase, ribonucleotídeo redutase e topoisomerase II, considerando a quercetina como uma candidata com múltiplos alvos para o tratamento das leishmanioses (DA SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012; MITTRA et al., 2000). Esses achados indicam que outros testes devem ser considerados em perspectiva para os compostos testados, considerando testes *in silico*, para a investigação de alvos, que possam estar envolvidos nos mecanismos de morte observados.

6.5 ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

Primeiramente, foram determinadas as concentrações não tóxicas da quercetina e de Q5, em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c. Os valores de CC_{50} não demonstraram citotoxicidade em concentrações iguais ou inferiores a 80 μ M (Figuras 15A e 15D). A dexametasona não foi citotóxica na concentração testada (20 μ M). Baseado nisso, testes subsequentes foram feitos em concentrações não superiores a 80 μ M.

O efeito anti-inflamatório dos compostos foi inicialmente avaliado em culturas de macrófagos peritoneais, pela análise da produção de óxido nítrico. Como esperado, a ativação macrofágica do LPS com IFN- γ aumentou a quantidade na produção de nitrito (Figuras 15B e 15E). O tratamento com a quercetina inibiu, de forma concentração-dependente, a produção de nitrito ($p < 0,05$). O composto penta acetilado (Q5) não demonstrou atividade semelhante em 20 μ M. Interessantemente, a atividade foi significativa nas maiores concentrações testadas (40 e 80 μ M), para os dois compostos. Na maior concentração testada (80 μ M), os efeitos dos compostos foram semelhantes ao observado em culturas de macrófagos ativados e tratados com dexametasona a 20 μ M.

Para uma melhor caracterização do efeito anti-inflamatório dos compostos (Q e Q5), a citocina inflamatória TNF foi quantificada pelo método ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). A estimulação macrofágica usando LPS + INF- γ induziu a um aumento proeminente na produção de TNF. O tratamento com Q e Q5 reduziu, significativamente, a produção de TNF ($p < 0,05$). Interessantemente, os efeitos dos compostos ocorreram de maneira concentração dependente (Figuras 15C e 15F).

A redução de fatores inflamatórios pela quercetina é diversamente descrita, inclusive na modulação para perfis inflamatórios TH2, relacionados com proteção em doenças neurais (BISPO DA SILVA et al., 2017; COSTA et al., 2016). Os dados aqui obtidos indicam sobre a conservação dos efeitos na

molécula semissintética, porém, a dosagem de outros fatores, como a citocina IL-10, pode ser uma perspectiva na avaliação desses perfis.

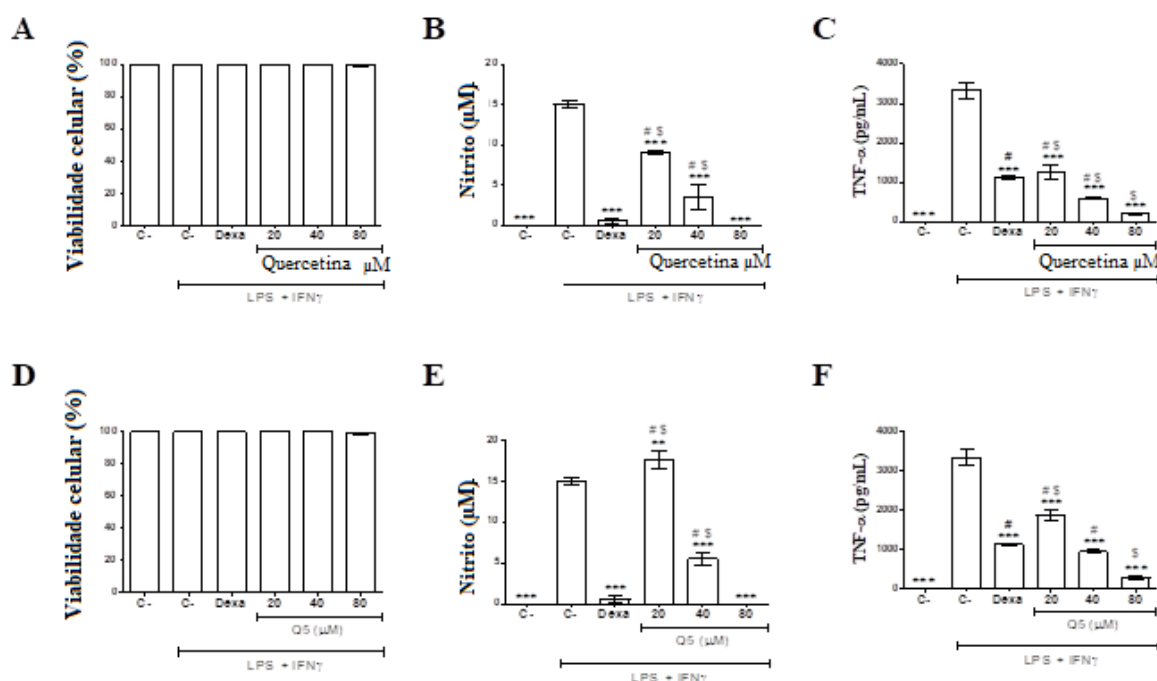


Figura 15. Efeitos da quercetina e do análogo quercetina-penta acetato em macrófagos (*in vitro*). Macrófagos do exsudato peritoneal estimulados ou não com LPS + IFN- γ foram cultivados na presença ou ausência dos compostos (20, 40 ou 80 μ M) ou dexametasona (20 μ M). A viabilidade celular foi determinada pelo método do Alamar Blue (Figuras A e D). O sobrenadante celular foi coletado depois de 24 horas para a quantificação do nitrito (Figuras B e E) ou 4 horas para a dosagem do TNF (Figuras C e F). - Grupo de células não tratadas e não estimuladas. C- Grupo de células estimuladas com LPS + IFN- γ . Os valores foram representados pela média $\pm$ desvio padrão da média de nove determinações obtidas de três experimentos independentes. *** P < 0,001 comparado a células estimuladas e não tratadas, ** p < 0,01 comparado a células estimuladas e não tratadas, # p < 0,05 comparado a células não estimuladas e não tratadas, e \$ p < 0,05 comparado a células tratadas com dexametasona.

A partir dos resultados encontrados, é importante endossar a respeito dos efeitos deletérios oriundos dos tratamentos com corticosteroides como vasculite, distúrbios gastrointestinais, alopecia, rash cutâneo, reações anafiláticas, dentre outros, e que flavonóides como Q, assim como compostos deles derivados,

como Q5, podem ser uma alternativa aos tratamentos com corticosteroides, em diversas patologias imunomediadas (D'ANDREA, 2015; SANTIAGO et al., 2021).

A ação anti-inflamatória da quercetina é bem descrita na literatura (MENDES et al., 2019; OZDAL et al., 2019), porém ainda são escassos os trabalhos que demonstram o potencial anti-inflamatório do análogo Q5. Este trabalho corrobora com os achados de Chen e colaboradores (2001), que evidenciaram o papel de Q e Q5 na inibição da produção de NO induzida por LPS, de forma concentração-dependente, sem efeitos citotóxicos deletérios para linhagem de macrófagos RAW 264.7 (CHEN et al., 2001). Mais além, esse trabalho se demonstrou inédito quanto ao efeito do Q5 na inibição da citocina pró-inflamatória TNF.

6.6 ATIVIDADE ANTICÂNCER

A citotoxicidade dos compostos (Q e Q5) testados foi avaliada em 20, 40 e 80 μ M, usando o método colorimétrico AlamarBlue em uma linhagem de células saudáveis (MRC-5, fibroblastos de pulmão humano) e, em duas linhagens diferentes de células cancerígenas, HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana), conforme mostra a Figura 16. A doxorrubicina foi o fármaco padrão, utilizada como controle positivo.

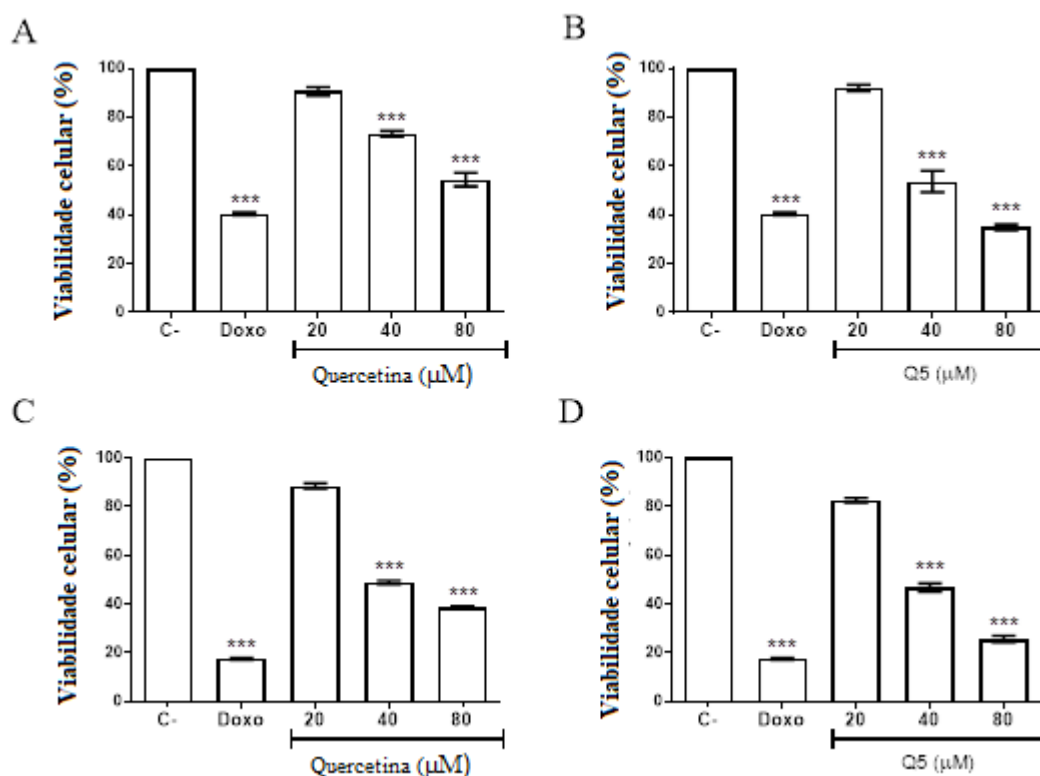


Figura 16. Efeitos da quercetina e do análogo quercetina-pentaacetato na viabilidade de células HepG2 (Figuras A e B) e HL-60 (Figuras C e D) - (20, 40 e 80 µM) ou doxorubicina (20 µM) determinada pelo AlamarBlue após 24, 48 ou 72 horas de tratamento. Valores representados como média ± DP de três experimentos independentes feitos em triplicata
***<0,005 comparado com células não tratadas.

Como revelado na Figura 6, para as células HepG2, a quercetina (Q) não apresentou atividade citotóxica significativa na maior concentração investigada (80 µM) e seu análogo pentaacetato (Q5) apresentou pouca atividade ($CI_{50} = 53,9 \pm 5,1 \mu M$). Para a linhagem de células cancerígenas HL-60, Q demonstrou ser pouco ativa ($CI_{50} = 51,3 \pm 0,4 \mu M$); porém, interessante, Q5 se mostrou significativamente mais ativa do que a quercetina com CI_{50} de $33,6 \pm 2,6 \mu M$. O fármaco padrão doxorubicina apresentou valores de CI_{50} variando de 0,1 a 0,2 µM para linhagens celulares cancerígenas, apresentando efeitos tóxicos significativos contra a linhagem de células saudáveis MRC-5 (Tabela 6), o que não foi visto para os compostos (Q e Q5).

Tabela 6. Citotoxicidade dos compostos Quercetina (Q) e Quercetina penta-acetato (Q5) frente a linhagem de células saudáveis MRC-5 (fibroblastos de pulmão humano) e linhagens diferentes de células cancerígenas: HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), HL-60 (leucemia promielocítica humana) e C6 (glioma de rato).

	Compostos testados (IC ₅₀ μM)			a
	Quercetina (Q)	Q5	Doxorrubicina	
Células cancerígenas				
CI ₅₀ (μM) ^a HL-60	51,30± (0,40)	33,60 (± 2,60)	0,20 (± 0,00)	
CI ₅₀ (μM) ^b HepG2	>80,00	53,90 ± (5,10)	0,10 (± 0,00)	
Célula não cancerígena				
CC ₅₀ MRC-5	>80,00	>80,00	0,90 (±0,00)	

Determinado em HL-60 incubada com os compostos por 72 horas. ^b determinado em HepG2 incubada com os compostos por 72 horas. ^c determinada em C6 incubada com os compostos por 72 horas. * MTT em células C6. Valores representados como média ± DP e foram calculados através de três experimentos independentes. CC50 = concentração citotóxica a 50%. CI50 = concentração inibitória a 50%.

O método colorimétrico de ensaio MTT foi usado para avaliar a citotoxicidade em cultura de células C6. Quercetina e Q5 induziram a uma diminuição na absorbância de MTT em 570 nm, o que representa a atividade desidrogenase mitocondrial e sugere uma diminuição na viabilidade celular em Células C6. Conforme revelado na Figura 17, a citotoxicidade induzida pela quercetina em células C6 em concentrações superiores a 25 µM por 72 h (Figura 17A), enquanto 0,78 µM de Q5 por 72 h foi capaz de diminuir viabilidade celular (Figura 4B). Foi observado que 50 µM de quercetina (Q) e Q5 diminuíram a viabilidade celular para 41,3% ± 2,9% e 47,5% ± 1,2%, respectivamente, quando comparada com o grupo controle (100,0% ± 6,4%) (Figura 4A,B). Nenhuma mudança significativa na viabilidade celular foi visualizada em culturas C6 tratadas com DMSO (0,05%), quando comparadas com células não tratadas.

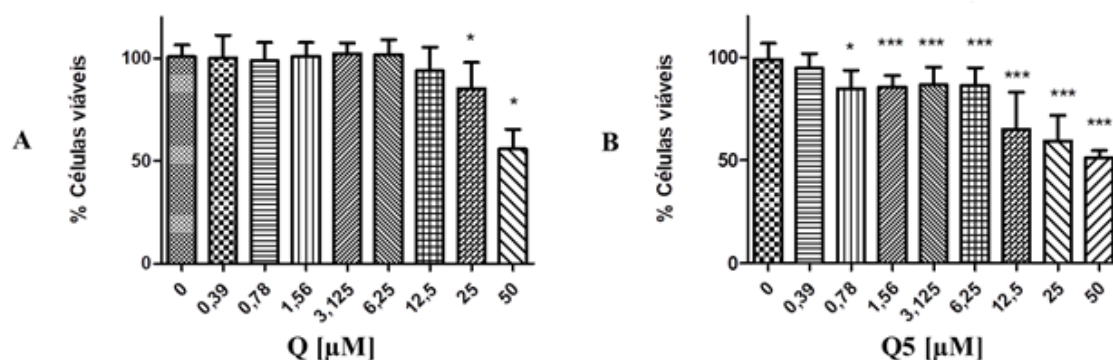


Figura 17. Análise da Atividade citotóxica pelo teste do MTT em células C6 expostas a quercetina (Q) e ao composto quercetina-pentaacetato (Q5), nas concentrações de 50 µM e 7 diluições 1:2. (A) C6 após 72 horas de exposição a quercetina. (B) C6 após 72 horas de exposição à quercetina pentaacetato (Q5). Células sob condições de controle foram tratadas com 0,05% de DMSO, um veículo para a diluição das drogas. Os resultados expressos em porcentagem em relação ao controle, tido como 100% (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). Os diferentes padrões das colunas são representativos das diferentes concentrações de quercetina (Q) em (A), e quercetina-pentaacetato (Q5) em B.

Poucos são os trabalhos que demonstram a atividade do análogo da quercetina Q5, em células de linhagens cancerígenas. No entanto, a atividade de Q5 em células da linhagem tumoral HeLa foi documentada por Danihelová e colaboradores (2013), os quais evidenciaram que ésteres acetilados da quercetina foram os derivados citotóxicos mais efetivos (DANIHELOVÁ et al., 2013).

Nenhum trabalho foi encontrado demonstrando o papel citotóxico Q5 em células da linhagem HepG2. Apenas, um trabalho foi encontrado na literatura revelando que o análogo tetra-acetilado da quercetina possui efeito significativo na inibição de células da linhagem LH-60, através da ativação de caspase-3, promovendo apoptose (SAKAO; FUJII; HOU, 2009).

Esse trabalho apresenta caráter inédito com relação ao análogo Q5 no tratamento de células de glioma C6. No entanto, Paola e colaboradores (2017) evidenciaram uma melhor ação de acil derivados da quercetina em de culturas de linhagens glioma humano U373-MG e glioma murino 9L, indicando caminhos de morte por apoptose (DELL'ALBANI et al., 2017).

A avaliação morfológica das células C6 tratadas com os compostos foi observada em microscópio óptico de contraste de fase (Figura 18). Observou-se que o análogo quercetina-pentaacetato (Q5) foi capaz de modificar o perfil morfológico das células C6 tratadas. Também, verificou-se que, após 72 h, Q5 foi capaz de induzir modificações nas células C6, para uma forma arredondada, a qual não foi encontrada relato, na literatura científica. Esse efeito não foi observado para as células tratadas com a quercetina, em que se verificou a indução para um perfil morfológico fusiforme, corroborando ao encontrado por Silva et al. (2019).

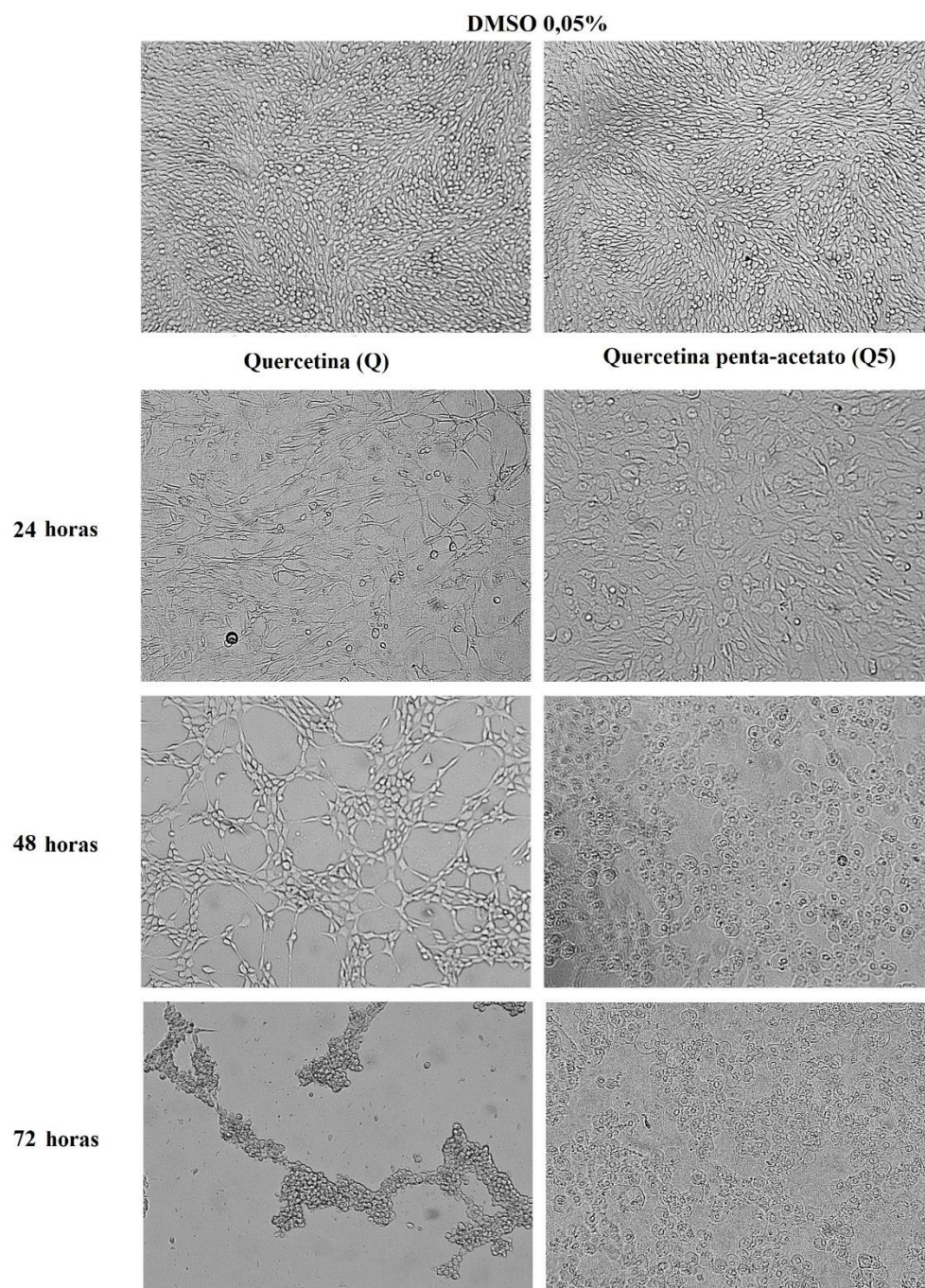


Figura 18. Análises das mudanças morfológicas de células C6 sob condições de controle (DMSO 0,5%), ou após 24, 48 e 72 horas de exposição a 50 μ M dos compostos quercetina (Que50) ou quercetina-pentaacetato (QP50).

Esses resultados obtidos corroboram com os encontrados por Danihelova et al. (2013), em que os grupos acetila inseridos na molécula da quercetina promoveram uma melhoria na atividade anticâncer. Para, além disso, indicam um tropismo maior para células cancerígenas, em especial para células de linhagens neurais. A modificação da morfologia celular para um perfil arredondado pode remeter a mecanismos de morte como apoptose, amplamente atribuídos à quercetina (COELHO et al., 2016). Mais além testes com células neurais saudáveis podem ajudar a elucidar tal suposição

Os resultados da atividade antiglioma da quercetina, demonstradas em células C6, também estão de acordo com os dados encontrados por Bispo da Silva e colaboradores (2019), que considerou as propriedades antiglioma da quercetina, e da rutina, correlacionadas às propriedades de modulação do perfil inflamatório da micróglia. Em perspectivas futuras, é interessante se observar os efeitos potencializados de Q5 em co-culturas de glioma/micróglia, sabendo-se da influência da micróglia na progressão do tumoral (DA SILVA et al., 2019).

7. CONCLUSÕES

A quercetina é um flavonóide pouco reativo, porém nas condições adaptadas para a reação de acetilação apresentou um bom rendimento na geração do análogo quercetina-pentaacetato (Q5). A caracterização do composto obtido por FTIR e, posteriormente, por RMN ^1H e ^{13}C , confirmou a conformação estrutural do análogo Q5 através da acetilação total da molécula da quercetina. O potencial farmacológico do composto obtido foi acessado através das avaliações do potencial antioxidante, antimicrobiano, antileishmania, imunomodulador e anticâncer. A estratégia da melhoria de compostos com ação comprovada e que podem ter seu efeito otimizado através da inserção de grupos hidrofóbicos é uma estratégia simples e que têm se mostrado bastante efetiva. Conclui-se que o composto sintetizado (Q5) demonstrou, através de alguns testes biológicos realizados, superioridade em relação a sua molécula original.

Sobre a atividade antioxidante, este trabalho demonstrou que o derivado Q5 foi menos efetivo do que Q, em sequestrar o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, corroborando ao encontrado na literatura sobre a superioridade da quercetina, em razão da ação das hidroxilas, em relação aos seus acil derivados. A atividade antimicrobiana dos compostos não demonstrou ação na maior concentração testada, no entanto, concentrações superiores podem ser acessadas em virtude da baixa taxa de toxicidade e da segurança demonstrada pelos compostos no tratamento de células saudáveis. Estudos futuros poderão ser realizados, não apenas para demonstrar o potencial bacteriostático e/ou bactericida das moléculas, mas também para demonstrar capacidade de modulação de fatores de virulência microbianos.

A atividade anti-Leishmania dos compostos Q e Q5, nas espécies estudadas, demonstrou-se pouco efetiva, mas a redução da CI_{50} , em uma das espécies, é indicativa de que a inserção de grupos acetila na molécula da quercetina potencializou, ainda que levemente, os efeitos citotóxicos da molécula, sem prejuízo significativo para a célula hospedeira.

Os potenciais resultados encontrados evidenciaram perfis anti-inflamatórios de Q e Q5, sobretudo em concentrações acima de 40 μM , em que apresentaram, efeitos mais acentuados do que o fármaco padrão dexametasona na inibição de TNF. Contudo, considerando-se os efeitos adversos oriundos de tratamentos com anti-inflamatórios esteroidais, a busca de mais evidências que possam co-substanciar o uso de compostos com atividade anti-inflamatória e pouco deletéria, como Q5, se torna necessária.

Em células de hepatocarcinoma humano (linhagem HepG2), o composto Q5 demonstrou inibir de forma significativa o crescimento celular com CI_{50} de 53,86 μM , o que não foi demonstrado por Q, o que comprova o sucesso da reação de acetilação em promover uma melhora do efeito biológico. Esse efeito melhorado, também, foi evidenciado quando se observou o efeito de Q (CI_{50} 51,26 μM) e Q5 (CI_{50} 33,55) sobre células de leucemia promielocítica aguda humana (linhagem LH-60). Interessantemente, em células saudáveis e não transformadas de fibroblasto de pulmão humano (linhagem MRC-5), o composto Q5 demonstrou não causar citotoxicidade significativa, indicando seletividade.

Em células C6 de glioma de rato, o análogo Q5 demonstrou um padrão de morte diferenciado com IC_{50} de 11,3 μM , e uma mudança morfológica para um perfil arredondado, ainda não observado na literatura, revelando-se promissor para que se possa continuar observando suas atividades na verificação dos mecanismos de morte envolvidos, além de indicar sobre a necessidade observação do comportamento biológico do análogo quercetina-pentaacetato frente a outros tipos de culturas celulares, em especial em culturas células neurais.

Neste contexto, as perspectivas futuras são promissoras para o estudo de outros efeitos biológicos promovidos pelos compostos Q e Q5, tanto em nível celular, como molecular. Mais além, outras rotas sintéticas reacionais e a manipulação dos grupos hidroxila da quercetina podem ser alvo para a busca de novos análogos com potencial biológico a serem estudados, sobretudo em células neurais, em que os resultados dos testes biológicos envolvendo a quercetina, tem sido os mais promissores.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A. M. Potential pharmacokinetic interactions between antiretrovirals and medicinal plants used as complementary and African traditional medicines. **Biopharmaceutics & drug disposition**, v. 28, n. 3, p. 135–143, 2007.
- ALDWELL, S. T. T. C. et al. Bioavailability of [2- 14 C] Quercetin-4 ' -glucoside in Rats. p. 12127–12137, 2008.
- ALVES, C. T. et al. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 139–146, 2014.
- ANGST, E. et al. The flavonoid quercetin inhibits pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. **Pancreas**, v. 42, n. 2, p. 223–229, 2013.
- AQUINO, P. et al. Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica e antibacteriana do extrato metanólico das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*. **Acta Biologica Colombiana**, v. 21, n. 1, p. 131–140, 2016.
- ARAÚJO, F. M. et al. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 105, n. May, p. 203–206, 2017.
- ARAÚJO, M. V. et al. Flavonoids induce cell death in: *Leishmania amazonensis*: In vitro characterization by flow cytometry and Raman spectroscopy. **Analyst**, v. 144, n. 17, p. 5232–5244, 2019.
- AZUMA, T. et al. Antimutagenic and α -glucosidase inhibitory effects of constituents from *Kaempferia parviflora*. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 471–475, 2011.
- BAGCHI, D. et al. Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 1, p. 75–80, 2004.
- BANERJEE, S. et al. Molecular Evidence for Increased Antitumor Activity of Gemcitabine by Genistein In vitro and In vivo Using an Orthotopic Model of Pancreatic Cancer. n. 19, p. 9064–9073, 2005.
- BANERJEE, S. et al. Efficacy of selected natural products as therapeutic agents against cancer. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 3, p. 492–496, 2008.
- BEAL, M. F. **Oxidative damage in neurodegenerative diseases** *Neuroscientist*, 1997.
- BIESAGA, M. et al. Critical Reviews in Analytical Chemistry Analytical Procedures for Determination of Quercetin and its Glycosides in Plant Material Analytical Procedures for Determination of Quercetin and its Glycosides in Plant Material. v. 8347, n. November, 2016.
- BISPO DA SILVA, A. et al. The flavonoid rutin modulates microglial/macrophage activation to a CD150/CD206 M2 phenotype. **Chemico-**

Biological Interactions, v. 274, p. 89–99, 2017.

BRAGANHOL, E. et al. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. **Anti-Cancer Drugs**, v. 17, n. 6, p. 663–671, 2006.

BRODOWSKA, K. M. Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. **European Journal of Biological Research**, v. 7, n. 2, p. 108–123, 2017.

CARDOSO, J. F.; JACKIX, E. A.; PIETRO, L. O papel dos polifenóis na Doença de Alzheimer: revisão sistemática. **Health Sci Inst**, v. 34, n. 4, p. 240–5, 2016.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer – A Review. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1236–1258, 2013.

CATANEO, A. H. D. et al. Quercetin promotes antipromastigote effect by increasing the ROS production and anti-amastigote by upregulating Nrf2/HO-1 expression, affecting iron availability. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 113, n. September 2018, p. 108745, 2019.

CHATZIATHANASIADOU, M. V et al. Amplifying and broadening the cytotoxic profile of quercetin in cancer cell lines through bioconjugation. **Amino Acids**, v. 50, n. 2, p. 279–291, 2018.

CHEN, X. et al. Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 6, p. 892–901, 2005.

CHEN, Y. C. et al. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 82, n. 4, p. 537–548, 2001.

CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A.; O'BANION, M. K. **Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed** *Journal of Neuroinflammation*, 2014.

COELHO, P. L. C. et al. Flavonoids from the Brazilian plant croton betulaster inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 34–43, 2016.

CONSTANTINO, A. I. et al. The soy isoflavone daidzein improves the capacity of tamoxifen to prevent mammary tumours q. v. 41, p. 647–654, 2005.

COSTA, J. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1c, p. 3, 2005.

COSTA, S. L. et al. Impact of Plant-Derived Flavonoids on Neurodegenerative Diseases. **Neurotoxicity Research**, v. 30, n. 1, p. 41–52, 2016.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

- CVOROVIC, J. et al. Oxidative stress-based cytotoxicity of delphinidin and cyanidin in colon cancer cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, n. 1, p. 151–157, 2010.
- D'ANDREA, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? **Fitoterapia**, v. 106, p. 256–271, out. 2015.
- DA SILVA, B. A. et al. Brain , Behavior , and Immunity The flavonoid rutin and its aglycone quercetin modulate the microglia inflammatory profile improving antiangioma activity. **Brain Behavior and Immunity**, n. May, p. 1–16, 2019.
- DA SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. DO C.; MAGALHÃES, P. P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target Leishmania (Leishmania) amazonensis arginase. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 183–188, 2012.
- DAJAS, F. Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 383–396, 2012.
- DANIHELOVÁ, M. et al. Antioxidant action and cytotoxicity on HeLa and NIH-3T3 cells of new quercetin derivatives. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 6, n. 4, p. 209–216, 2013.
- DE BOER, V. C. J. et al. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 7, p. 1718–25, 2005.
- DE CAMARGO, M. S.; GONÇALVES RADDI, M. S. EFEITO DA QUERCETINA SOBRE O CRESCIMENTO E ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE *Staphylococcus aureus*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 3, p. 71–78, 2010.
- DEGRYSE, B. et al. The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. **Journal of Cell Biology**, v. 152, n. 6, p. 1197–1206, 2001.
- DEHGHAN, G.; KHOSHKAM, Z. Tin(II)-quercetin complex: Synthesis, spectral characterisation and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 422–426, 2012.
- DELL'ALBANI, P. et al. European Journal of Pharmaceutical Sciences Quercetin derivatives as potent inducers of selective cytotoxicity in glioma cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, p. 56–65, 2017.
- DOS SANTOS, T. B. Immunology and Immunotherapy. **imunology and immunotherapy**, v. 3, n. 2, p. 223–242, 2016.
- DOURADO, N. S. et al. Neuroimmunomodulatory and Neuroprotective Effects of the Flavonoid Apigenin in in vitro Models of Neuroinflammation Associated With Alzheimer's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 12, n. May, p. 1–14, 2020.
- DRUMMOND, E. M. et al. Inhibition of proinflammatory biomarkers in THP1 macrophages by polyphenols derived from chamomile, meadowsweet and willow bark. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 4, p. 588–594, 2013.

EBEGBONI, V. J. et al. The effects of flavonoids on human first trimester trophoblast spheroidal stem cell self-renewal, invasion and JNK/p38 MAPK activation: Understanding the cytoprotective effects of these phytonutrients against oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, v. 164, p. 289–298, 2019.

EBEGBONI, V. J.; DICKENSON, J. M.; SIVASUBRAMANIAM, S. D. Antioxidative effects of flavonoids and their metabolites against hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in a human first trimester trophoblast cell line. **Food Chemistry**, v. 272, p. 117–125, 2019.

ENAYAT, S. et al. CHNQ, a novel 2-Chloro-1,4-naphthoquinone derivative of quercetin, induces oxidative stress and autophagy both in vitro and in vivo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 596, p. 84–98, 2016.

FAIXOVÁ, D. et al. Review Antiparasitic effects of selected isoflavones on flatworms. p. 1–16, 2021.

FALLARERO, A.; HANSKI, L.; VUORELA, P. How to Translate a Bioassay into a Screening Assay for Natural Products: General Considerations and Implementation of Antimicrobial Screens. **Planta Medica**, v. 80, n. 14, p. 1182–1199, 2014.

FARHADI, L. et al. Low Concentrations of Flavonoid - Rich Fraction of Shallot Extract Induce Delayed - Type Hypersensitivity and TH1 Cytokine IFN γ Expression in BALB/c Mice. **International journal of molecular and cellular medicine**, v. 3, n. 1, p. 16–25, 2014.

FARRELL, T. L. et al. Absorption of dimethoxycinnamic acid derivatives in vitro and pharmacokinetic profile in human plasma following coffee consumption. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 56, n. 9, p. 1413–1423, 2012.

FIORANI, M. et al. Quercetin prevents glutathione depletion induced by dehydroascorbic acid in rabbit red blood cells. **Free Radical Research**, v. 34, n. 6, p. 639–648, 2001.

FIORANI, M. et al. Mitochondria accumulate large amounts of quercetin: Prevention of mitochondrial damage and release upon oxidation of the extramitochondrial fraction of the flavonoid. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 5, p. 397–404, 2010.

FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 12, p. 1061–1080, 1995.

FOTI, M. C.; ROCCO, C. Unveiling the chemistry behind bromination of quercetin: The “violet chromogen”. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 9, p. 1602–1607, 2014.

FRATANTONIO, D. et al. Curcumin potentiates the antitumor activity of

Paclitaxel in rat glioma C6 cells. **Phytomedicine**, v. 55, n. June 2018, p. 23–30, 2019.

GARCIA-ALONSO, M. et al. Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 7, p. 521–529, 2009.

GERLACH, M. et al. Altered Brain Metabolism of Iron as a Cause of Neurodegenerative Diseases? **Journal of Neurochemistry**, v. 63, n. 3, p. 793–807, 2002.

GLASS, C. K. et al. **Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration** CellElsevier Inc., , 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>>

GONÇALVES, M. et al. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF A QUERCETIN-TETRAETHYL ETHER-BASED PHOTOPROTECTIVE NANOEMULSION. **Química Nova**, v. 42, n. 4, p. 365–370, 2019.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GUO, Y.; BRUNO, R. S. Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 3, p. 201–210, 2015.

GUPTA, S.; HUSSAIN, T.; MUKHTAR, H. Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, n. 1, p. 177–185, 2003.

HAFEEZ, B. BIN; SIDDIQUI, I. A.; ASIM, M. A Dietary Anthocyanidin Delphinidin Induces Apoptosis of Human Prostate Cancer PC3 Cells In vitro and In vivo : Involvement of Nuclear Factor- κ B Signaling. p. 8564–8572, 2008.

HAMPTON, T. “Promiscuous” anticancer drugs that hit multiple targets may thwart resistance. **Journal of the American Medical Association**, v. 292, n. 4, p. 4–5, 2004.

HAQ, S. H.; ALAMRO, A. A. Neuroprotective effect of quercetin in murine cortical brain tissue cultures. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 23, p. 89–96, 2019.

HASSAAN, Y. et al. Evaluation of plant phenolic metabolites as a source of Alzheimer’s drug leads. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

HAUSER-DAVIS, C. R. A. **SÍNTESE , CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE UMA NOVA HIDRAZONA ANTIOXIDANTE : POTENCIAL MPAC**. [s.l: s.n.].

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572–584, 2002.

HELGREN, T. R. et al. The synthesis, antimalarial activity and CoMFA analysis of novel aminoalkylated quercetin analogs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 2, p. 327–332, 2015.

HIRAI, I. et al. Characterisation of anti-Staphylococcus aureus activity of quercetin. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 6, p. 1250–1254, 2010.

HIRPARA, K. et al. Quercetin and Its Derivatives: Synthesis, Pharmacological Uses with Special Emphasis on Anti-Tumor Properties and Prodrug with Enhanced Bio-Availability. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 138–161, 2012.

HISANAGA, A. et al. Anti-inflammatory effects and molecular mechanisms of 8-prenyl quercetin. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 60, n. 5, p. 1020–1032, 2016.

HO, M.; CHEN, P.; CHEN, J. Peonidin 3-Glucoside Inhibits Lung Cancer Metastasis by Downregulation of Proteinases Activities and MAPK. v. 62, n. 4, p. 505–516, 2010.

HOSSION, A. M. L. et al. Quercetin diacylglycoside analogues showing dual inhibition of DNA gyrase and topoisomerase IV as novel antibacterial agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 3686–3703, 2011.

HUANG, W. W. et al. Kaempferol induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathway in human osteosarcoma U-2 OS cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, n. 11, p. 1585–1595, 2010.

INCA. **Estimativa/2020 – Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 14 jul. 2000.

JACOBASCH, G. et al. Pharmacokinetics and Bioavailability of Quercetin Glycosides in Humans. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, n. 5, p. 492–499, 2003.

JEON, S. et al. Quercetin attenuates the injury-induced reduction of γ -enolase expression in a middle cerebral artery occlusion animal model. **Laboratory Animal Research**, v. 33, n. 4, p. 308, 2018.

KANE, S. N.; MISHRA, A.; DUTTA, A. K. Preface: International Conference on Recent Trends in Physics (ICRTP 2016). **Journal of Physics: Conference Series**, v. 755, n. 1, 2016.

KHAN, F. et al. **Molecular targets underlying the anticancer effects of quercetin: An update** *Nutrients*, 2016.

KHAN, M. K.; DANGLES, O. Accepted. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2013.

KIM, J. K.; PARK, S. U. QUERCETIN AND ITS ROLE IN BIOLOGICAL FUNCTIONS : AN UPDATED REVIEW Division of Life Sciences and Convergence Research Center for Insect Vectors , Incheon Dear Editor ,

pentahydroxyflavone by the International Union of Pure and Appli. v. 17, n. Table 1, p. 856–863, 2018.

KIM, M. et al. Synthesis of alkyl quercetin derivatives. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 343–348, 2015.

KLINGEMANN, J.; TESCH, T.; WÄSCH, J. Cooperative Data Management and its Application to Mobile Computing. **International Journal of Cooperative Information Systems**, v. 06, n. 03n04, p. 341–365, 1997.

LAKHANPAL, P.; RAI, D. K. Quercetin: A Versatile Flavonoid. **Internet Journal of Medical Update - EJOURNAL**, v. 2, n. 2, p. 22–37, 2007.

LEE, J. H. et al. Multidrug and toxic compound extrusion protein-1 (MATE1/SLC47A1) is a novel flavonoid transporter. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 40, p. 9690–9698, 2014.

LEE, Y. Y. et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Mechanism of Tangeretin in Activated Microglia. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 294–305, 2016.

LESJAK, M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. **Journal of Functional Foods**, v. 40, n. November 2016, p. 68–75, 2018.

LI, S. et al. Effect of Hesperidin Extraction on Cell Proliferation and Apoptosis of CNE-2Z Cells. n. Bmei, p. 2024–2027, 2010.

LIAO, H. et al. O-Alkylated derivatives of quercetin induce apoptosis of MCF-7 cells via a caspase-independent mitochondrial pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v. 242, p. 91–98, 2015.

LIN, Y. et al. Luteolin, a Flavonoid with Potential for Cancer Prevention and Therapy. **Current Cancer Drug Targets**, v. 8, n. 7, p. 634–646, 2008.

LIU, X. et al. Anti-breast cancer potential of daidzein in rodents. **Life Sciences**, v. 91, n. 11–12, p. 415–419, 2012.

LU, M.; XIAO, Z.; ZHANG, H. Biochemical and Biophysical Research Communications Where do health benefits of flavonoids come from ? Insights from flavonoid targets and their evolutionary history. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 434, n. 4, p. 701–704, 2013.

LUCAS, L.; RUSSELL, A.; KEAST, R. Molecular Mechanisms of Inflammation. Anti-Inflammatory Benefits of Virgin Olive Oil and the Phenolic Compound Oleocanthal. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 8, p. 754–768, 2011.

MAHTO, S. K.; CHANDRA, P.; RHEE, S. W. In vitro models, endpoints and assessment methods for the measurement of cytotoxicity. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 2, n. 2, p. 87–93, 2010.

MANJOLIN, L. C. et al. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2253–2262, 2013.

MARYAM MOHAJERI, LOTFOLLAH SAGHAEI, M. G. et al. Case Report A Case of Mayer – Rokitansky – Küster – Hauser Syndrome with a Fused Pancake - shaped Pelvic Kidney. **Advanced Biomedical Research**, v. 6, n. 105, p. 1–13, 2019.

MASCI, A. et al. Neuroprotective effect of brassica oleracea sprouts crude juice in a cellular model of alzheimer's disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.

MASSI, A. et al. Research progress in the modification of quercetin leading to anticancer agents. **Molecules**, v. 22, n. 8, 2017.

MATERSKA, M. QUERCETIN AND ITS DERIVATIVES : CHEMICAL STRUCTURE AND BIOACTIVITY -A REVIEW. **Polish journal of food and nutrition sciences**, v. 58, n. 4, p. 407–413, 2008.

MATTAREI, A. et al. Regioselective O-derivatization of quercetin via ester intermediates. An improved synthesis of rhamnetin and development of a new mitochondriotropic derivative. **Molecules**, v. 15, n. 7, p. 4722–4736, 2010.

MAUÉS, L. A. L. et al. Flavonoids from the Amazon plant Brosimum acutifolium induce C6 glioma cell line apoptosis by disrupting mitochondrial membrane potential and reducing AKT phosphorylation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 113, n. December 2018, p. 108728, 2019.

MENDES, F. E. T. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e citoprotetora da quercetina contra a ação tóxica do cloreto de bário. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e12610615632, 2021.

MENDES, L. F. et al. Flavonoid-mediated immunomodulation of human macrophages involves key metabolites and metabolic pathways. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

MENON, L. G.; KUTTAN, R.; KUTTAN, G. Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. v. 141, n. March, 1999.

MERCADO-CAMARGO, J. et al. Homology Modeling of Leishmanolysin (gp63) from Leishmania panamensis and Molecular Docking of Flavonoids. 2020.

MERT, D. G. et al. The influence of quercetin on recognition memory and brain oxidative damage in a ketamine model of schizophrenia. **Psychiatry and Clinical Psychopharmacology**, v. 29, n. 1, p. 1–7, 2019.

MITTRA, B. et al. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 6, n. 6, p. 527–541, 2000.

MOON, J. H. et al. Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 279, n. 2, p. R461-7, 2000.

MORABITO, N. et al. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on

bone loss in early postmenopausal women: A randomized double-blind placebo-controlled study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 10, p. 1904–1912, 2002.

MUKAI, R. **Prenylation enhances the biological activity of dietary flavonoids by altering their bioavailability** *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* Taylor & Francis, , 2018. Disponível em: <<http://doi.org/10.1080/09168451.2017.1415750>>

MULHOLLAND, P. J. et al. Pre-clinical and clinical study of QC12, a water-soluble, pro-drug of quercetin. **Annals of Oncology**, v. 12, n. 2, p. 245–248, 2001.

MUROTA, K.; NAKAMURA, Y.; UEHARA, M. **Flavonoid metabolism: The interaction of metabolites and gut microbiota** *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* Taylor & Francis, , 2018. Disponível em: <<http://doi.org/10.1080/09168451.2018.1444467>>

MUROTA, K.; TERAOKA, J. Antioxidative flavonoid quercetin: Implication of its intestinal absorption and metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 417, n. 1, p. 12–17, 2003.

MUTHIAN, G.; BRIGHT, J. J. Quercetin, a Flavonoid Phytoestrogen, Ameliorates Experimental Allergic Encephalomyelitis by Blocking IL-12 Signaling Through JAK-STAT Pathway in T Lymphocyte. **Journal of Clinical Immunology**, v. 24, n. 5, p. 542–552, 2004.

NAIR, H. K. et al. Inhibition of Prostate Cancer Cell Colony Formation by the Flavonoid Quercetin Correlates with Modulation of Specific Regulatory Genes. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 1, p. 63–69, 2004.

NAIR, M. P. N. et al. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN γ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1593, n. 1, p. 29–36, 2002.

NATARAJAN, N. et al. Effect of flavonone hesperidin on the apoptosis of human mammary carcinoma. v. 1, p. 207–215, 2011.

NÉMETH, K. et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. **European Journal of Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 29–42, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

NGUYEN, M. A. et al. The Influence of Single-Dose and Short-Term Administration of Quercetin on the Pharmacokinetics of Midazolam in Humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3199–3207, 2015.

NICOLÁS, O.; REY, A.; HAUSER-DAVIS, C. R. A. Síntese , caracterização e avaliação da toxicidade de novas hidrazonas antioxidantes : potenciais MPACs

para o tratamento da Doença de Alzheimer. n. Figura 1, 2013.

NISHIJIMA, T. et al. Simultaneous ingestion of high-methoxy pectin from apple can enhance absorption of quercetin in human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 10, p. 1531–1538, 2015.

OH, W. Y.; AMBIGAIPALAN, P.; SHAHIDI, F. Preparation of Quercetin Esters and Their Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 38, p. 10653–10659, 2019.

OLANOW, C. W.; TATTON, W. G. Etiology and Pathogenesis of Parkinson ' S Disease. n. Figure 1, p. 1–15, 1999.

OLIVEIRA COSTA, J. F. et al. Potent anti-inflammatory activity of betulinic acid treatment in a model of lethal endotoxemia. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 469–474, 2014.

OMAR, K. et al. The complex degradation and metabolism of quercetin in rat hepatocyte incubations. **Xenobiotica**, v. 44, n. 12, p. 1074–1082, 2014.

OZDAL, Z. D. et al. Synthesis of gold and silver nanoparticles using flavonoid quercetin and their effects on lipopolysaccharide induced inflammatory response in microglial cells. **3 Biotech**, v. 9, n. 6, p. 1–8, 2019.

ÖZYÜREK, M. et al. Novel oxime based flavanone, naringin-oxime: Synthesis, characterization and screening for antioxidant activity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 212, n. 1, p. 40–46, 2014.

PAGANGA, G.; RICE-EVANS, C. A. The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. **FEBS Letters**, v. 401, n. 1, p. 78–82, 1997.

PARK, D.-J.; SHAH, F.-A.; KOH, P.-O. Quercetin attenuates neuronal cells damage in a middle cerebral artery occlusion animal model. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 4, p. 676–683, 2018.

PATEL, R. V et al. **Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent** *European Journal of Medicinal Chemistry* Elsevier Masson SAS, , jul. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.053>>

PEKAL, A.; BIESAGA, M.; PYRZYNSKA, K. Interaction of quercetin with copper ions: Complexation, oxidation and reactivity towards radicals. **BioMetals**, v. 24, n. 1, p. 41–49, 2011.

PETERSEN, B. et al. Bioavailability of quercetin in humans and the influence of food matrix comparing quercetin capsules and different apple sources. **Food Research International**, v. 88, p. 159–165, 2016.

POCERNICH, C. B.; BUTTERFIELD, D. A. Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5, p. 625–630, 2012.

PÔRTO, W. G. Radicais Livres e Neurodegeneração. Entendimento Fisiológico: Base para Nova Terapia? **Rev. Neurociências**, v. 9, n. 2, p. 70–76, 2001.

PRADHAN, S. J. et al. Quercetin and sulforaphane in combination suppress the progression of melanoma through the down-regulation of matrix metalloproteinase-9. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 1, n. 6, p. 915–920, 2010.

PRINCE, M. et al. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. **Alzheimer's and Dementia**, v. 9, n. 1, p. 63- 75.e2, 2013.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Switzerland)**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 2012.

RANGEL-ORDÓÑEZ, L. et al. Plasma levels and distribution of flavonoids in rat brain after single and repeated doses of standardized Ginkgo biloba extract EGb 761®. **Planta Medica**, v. 76, n. 15, p. 1683–1690, 2010.

RASSI FERNANDES, M.; RIBEIRO PEDROSO, A. Animal experimentation: A look into ethics, welfare and alternative methods experiMentaÇÃO aniMal: uM olhar soBre Ética, BeM-estar e MÉtodos alternativos. **Rev Assoc Med Bras**, v. 63, n. 11, p. 923–928, 2017.

RAÚL F. GUERREROA, MARIA C. GARCÍA-PARRILLAB, B. P. AND E. C.-V. NPC Natural Product Communications. **Natural Product Communications**, v. 1, n. 4, p. 9–12, 2010.

RENGASAMY, K. R. R. et al. The role of flavonoids in autoimmune diseases: Therapeutic updates. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 194, p. 107–131, 2019.

RIBEIRO, L. M. B. C. et al. Structure-activity relationships and mechanism of action of tetragomycin derivatives as inhibitors of Staphylococcus aureus staphyloxanthin biosynthesis. **Microbial Pathogenesis**, v. 144, n. February, p. 104127, 2020.

RUIJTERS, E. J. B. et al. Food-derived bioactives can protect the anti-inflammatory activity of cortisol with antioxidant-dependent and -independent mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, 2016.

SAK, K. Site-specific anticancer effects of dietary flavonoid quercetin. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 2, p. 177–193, 2014.

SAKAO, K.; FUJII, M.; HOU, D. X. Acetyl derivate of quercetin increases the sensitivity of human leukemia cells toward apoptosis. **BioFactors**, v. 35, n. 4, p. 399–405, 2009.

SANTIAGO, L. Â. M. et al. Flavonoids, alkaloids and saponins: are these plant-derived compounds an alternative to the treatment of rheumatoid arthritis? A literature review. **Clinical Phytoscience**, v. 7, n. 1, 2021.

SANTOS, B. L. et al. Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. **Chemico-Biological Interactions**, v. 242, p. 123–138, 2015.

SHARMA, D. et al. In silico and in vitro approach of *Allium cepa* and isolated quercetin against MDR bacterial strains and *Mycobacterium smegmatis*. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 29–35, 2019.

SHI, Y.; WILLIAMSON, G. Comparison of the urinary excretion of quercetin glycosides from red onion and aglycone from dietary supplements in healthy subjects: A randomized, single-blinded, cross-over study. **Food and Function**, v. 6, n. 5, p. 1443–1448, 2015.

SILVA, V.; SEGURA-AGUILAR, J. State and perspectives on flavonoid neuroprotection against aminochrome-induced neurotoxicity. **Neural Regeneration Research**, v. 16, n. 9, p. 1797–1798, 2021.

SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: [s.n.].

SIMONYI, A. et al. Inhibition of microglial activation by elderberry extracts and its phenolic components. **Life Sciences**, v. 128, p. 30–38, 2015.

SPENCER, J. P. E. et al. **Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action**. Molecular Aspects of Medicine. **Anais...** Elsevier Ltd, 2012Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.016>>

TAMURA, M. et al. Quercetin metabolism by fecal microbiota from healthy elderly human subjects. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–13, 2017.

TAN, W. F. et al. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. **European Journal of Pharmacology**, v. 459, n. 2–3, p. 255–262, 2003.

TANG, Y. et al. 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid is a predominant biologically-active catabolite of quercetin glycosides. **Food Research International**, v. 89, p. 716–723, 2016.

TASDEMIR, D. et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: In vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1352–1364, 2006.

TAYLOR, M. A.; KHATHAYER, F.; RAY, S. K. Quercetin and Sodium Butyrate Synergistically Increase Apoptosis in Rat C6 and Human T98G Glioblastoma Cells Through Inhibition of Autophagy. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 7, p. 1715–1725, 2019.

TRABER, P. G. **Colon Cancer Prevention: Dietary Modulation of Cellular and Molecular Mechanisms**. 1. ed. [s.l.] Springer US, 1999.

USZNYÁK, ST. ; SZENT-GYÖRGYI, A. Rusznyak_1936_Nature.pdf. **Nature**, v. 138, n. 3479, p. 27–29, 1936.

VEVERKA, M. et al. Cocrystals of quercetin: Synthesis, characterization, and screening of biological activity. **Monatshefte für Chemie**, v. 146, n. 1, p. 99–109, 2015.

W.J. LEE; FANG, W. Investigators from Taipei Medical University Target Leukemia (Quercetin induces mitochondrial-derived apoptosis via reactive oxygen species-mediated ERK activation in HL-60 leukemia cells and xenograft). **Hematology Week**, 2015.

WALLE, T.; WALLE, U. K.; HALUSHKA, P. V. Carbon Dioxide Is the Major Metabolite of Quercetin in Humans. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 10, p. 2648–2652, 2001.

WANG, J.; ELTOUM, I.; LAMARTINIERE, C. A. Dietary genistein suppresses chemically induced prostate cancer in Lobund – Wistar rats. v. 186, p. 11–18, 2002.

WANG, S. W. et al. Rutin inhibits β -amyloid aggregation and cytotoxicity, attenuates oxidative stress, and decreases the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines. **NeuroToxicology**, v. 33, n. 3, p. 482–490, 1 jun. 2012.

WANG, T.; LI, Q.; BI, K. Bioactive flavonoids in medicinal plants : Structure , activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 12–23, 2018.

WANG, W. et al. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 56, p. 21–38, 2016.

WANG, Y.; CHEN, S.; YU, O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 949–956, 2011.

WHO. **Who Report on Cancer**. [s.l: s.n.].

WONG, I. L. K. et al. Quinacrine and a novel apigenin dimer can synergistically increase the pentamidine susceptibility of the protozoan parasite Leishmania. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 6, p. 1179–1190, 2009.

WU, L. et al. Quercetin shows anti-tumor effect in hepatocellular carcinoma LM3 cells by abrogating JAK2/STAT3 signaling pathway. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 10, p. 4806–4820, 2019.

ZHAO, J. L.; ZHAO, J.; JIAO, H. J. Synergistic growth-suppressive effects of quercetin and cisplatin on HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 784–791, 2014.

ZHAO, M. et al. Immunomodulatory and anticancer activities of flavonoids extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 2, p. 162–166, 2007.

ZIELIŃSKA, M.; GÜLDEN, M.; SEIBERT, H. Effects of quercetin and quercetin-3-O-glycosides on oxidative damage in rat C6 glioma cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 1, p. 47–53, 2003.

ANEXOS

Anexo A. Artigo Científico publicado no periódico *Molecules* (Qualis A1).

Article

Structural Design, Synthesis and Antioxidant, Antileishmania, Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of a Novel Quercetin Acetylated Derivative

Saul Vislei Simões da Silva ¹, Orlando Maia Barboza ¹, Jéssica Teles Souza ², Érica Novaes Soares ², Cleonice Creusa dos Santos ², Luciano Vasconcellos Pacheco ^{1,3}, Ivanilson Pimenta Santos ³, Tatiana Barbosa dos Santos Magalhães ¹, Milena Botelho Pereira Soares ^{3,4}, Elisalva Teixeira Guimarães ^{1,3}, Cássio Santana Meira ^{1,3,4}, Sílvia Lima Costa ² , Victor Diógenes Amaral da Silva ², Lourenço Luís Botelho de Santana ¹ and Aníbal de Freitas Santos Júnior ^{1,*} 

¹ Department of Life Sciences, State University of Bahia (UNEB), Salvador 41150-000, BA, Brazil; saulvislei@gmail.com (S.V.S.d.S.); orlandomb0@gmail.com (O.M.B.); lucianofcd@hotmail.com (L.V.P.); tatibasa@hotmail.com (T.B.d.S.M.); etguimaraes@uneb.br (E.T.G.); cassio.meira@fieb.org.br (C.S.M.); lourencoluisbotelho@gmail.com (L.L.B.d.S.)

² Laboratory of Neurochemistry and Cell Biology, Department of Biochemistry and Biophysics, Federal University of Bahia, Salvador 40231-300, BA, Brazil; telles.jessica@hotmail.com (J.T.S.); ericanovaessoares@gmail.com (É.N.S.); cleonicemev@gmail.com (C.C.d.S.); costasl@ufba.br (S.L.C.); vdsilva@ufba.br (V.D.A.d.S.)

³ Gonçalo Moniz Institute, FIOCRUZ, Salvador 40296-710, BA, Brazil; eagle_nito@hotmail.com (I.P.S.); milena@bahia.fiocruz.br (M.B.P.S.)

⁴ SENAI Institute of Innovation in Health Advanced Systems (CIMATEC ISI SAS), University Center SENAI/CIMATEC, Salvador 41650-010, BA, Brazil

* Correspondence: anibaljrr@uol.com.br or afjunior@uneb.br; Tel.: +55-71-3117-5313



Citation: da Silva, S.V.S.; Barboza, O.M.; Souza, J.T.; Soares, É.N.; dos Santos, C.C.; Pacheco, L.V.; Santos, I.P.; Magalhães, T.B.d.S.; Soares, M.B.P.; Guimarães, E.T.; et al.

Structural Design, Synthesis and Antioxidant, Antileishmania, Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of a Novel Quercetin Acetylated Derivative. *Molecules* **2021**, *26*, 6923. <https://doi.org/10.3390/molecules26226923>

Academic Editors: Jianbo Xiao and H. P. Vasantha Rupasinghe

Received: 19 October 2021

Accepted: 14 November 2021

Published: 17 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Quercetin (Q) is a bioflavonoid with biological potential; however, poor solubility in water, extensive enzymatic metabolism and a reduced bioavailability limit its biopharmacological use. The aim of this study was to perform structural modification in Q by acetylation, thus, obtaining the quercetin pentaacetate (Q5) analogue, in order to investigate the biological potentials (antioxidant, antileishmania, anti-inflammatory and cytotoxicity activities) in cell cultures. Q5 was characterized by FTIR, ¹H and ¹³C NMR spectra. The antioxidant potential was evaluated against the radical ABTS^{•+}. The anti-inflammatory potential was evaluated by measuring the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF) and the production of nitric oxide (NO) in peritoneal macrophages from BALB/c mice. Cytotoxicity tests were performed using the AlamarBlue method in cancer cells HepG2 (human hepatocarcinoma), HL-60 (promyelocytic leukemia) and MCR-5 (healthy human lung fibroblasts) as well as the MTT method for C6 cell cultures (rat glioma). Q and Q5 showed antioxidant activity of 29% and 18%, respectively, which is justified by the replacement of hydroxyls by acetyl groups. Q and Q5 showed concentration-dependent reductions in NO and TNF production ($p < 0.05$); Q and Q5 showed higher activity at concentrations $> 40 \mu\text{M}$ when compared to dexamethasone ($20 \mu\text{M}$). For the HL-60 lineage, Q5 demonstrated selectivity, inducing death in cancer cells, when compared to the healthy cell line MRC-5 ($\text{IC}_{50} > 80 \mu\text{M}$). Finally, the cytotoxic superiority of Q5 was verified ($\text{IC}_{50} = 11 \mu\text{M}$), which, at $50 \mu\text{M}$ for 24 h, induced changes in the morphology of C6 glioma cells characterized by a round body shape (not yet reported in the literature). The analogue Q5 had potential biological effects and may be promising for further investigations against other cell cultures, particularly neural ones.

Keywords: quercetin; synthesis; quercetin pentaacetate; antioxidant; antileishmania; anti-inflammatory; cytotoxicity activity

1. Introduction

Quercetin is a bioflavonoid with a proven impact on health and well-documented biochemical activities. This compound is considered one of the most potent antioxidants among polyphenols [1–3]. Due to its properties, quercetin has been tested for various therapeutic applications, such as antioxidant, antiparasitic, anti-inflammatory and anti-cancer activities [4,5]. In parasitic diseases, flavonoids are a high interest group. This is due to their low toxicity in hosts and several mechanisms by which they can modulate pathologically altered processes during infections [6]. Flavonoids have multiple targets for treating leishmaniasis and include targets, such as arginase, ribonucleotide reductase and topoisomerase II [7,8].

Quercetin has multiple anticancer activities in several types of solid tumors. Furthermore, it has been proven to have activity in HL-60 cells (originating from acute myeloid leukemia (AML)) to significantly reduce tumor growth by reducing intratumoral oxidative stress, activation of the Extracellular Regulated Kinase (ERK) signal and subsequent apoptosis [9]. Quercetin improved the pro-inflammatory response by reducing IL-6 and TNF expression with positive anti-inflammatory activity in human THP1 macrophage populations [10].

Among the different types of cancer, glioma is one of the most aggressive and with poor prognosis. Unfortunately, main therapies (surgical removal, radiation therapy and chemotherapy) are not efficient. The average of overall survival for patients remains at approximately 14 months [11]. Nevertheless, new compounds, such as temozolomide [12], retinoids [13] and flavonoids [14] have shown anti-glioma activity. The antitumoral effects of quercetin have been described against cells from glioblastoma, which is the most aggressive of the gliomas [15].

Abnormal immune responses are involved in the initiation and development of a large number of diseases, including autoimmune diseases, allergies, cancer and neurodegenerative diseases. Flavonoids have potential immunomodulatory activity and are studied as alternatives for clinical use. Quercetin can exert significant immunomodulatory effects on the cellular production of cytokines derived from the Th-1 and Th-2 profile and lymphocytic proliferation, regulating cellular immunity [16]. Furthermore, quercetin can differentially modulate the expression of interleukin genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), favoring the Th-1 profile, which promotes cellular immunity by interferon gamma (IFN- γ), the reduction of the Th-2 profile involved in humoral immunity and macrophage activation by IL-4 [17].

The low water solubility, extensive metabolism and enzymatic degradation limit bioavailability and reduce the biopharmacological use of quercetin as a therapeutic agent [13]. An interesting approach to overcome the low bioavailability of polyphenols, in order to test and explore their *in vivo* activity, is the chemical modification of the natural compound, increasing solubility and slowing down metabolism. Thus, many synthetic routes are being studied, such as acetylation, addition of amines and bromination, modification to oximes and complexation with hydrazines [18–20].

In this study, we perform a structural modification in quercetin, aiming to obtain the analogue quercetin pentaacetate (Q5) for evaluation of the antioxidant potential, anti-inflammatory activity and inhibition of the growth of cancer cells, hepatocarcinoma (HepG2), promyelocytic leukemia (HL-60) and rat glioma (C6) cells.

2. Results and Discussion

2.1. Synthesis and Characterization

For the synthesis of the analogue quercetin (3,3',4',5,7-pentaacetate), the total acetylation approach was used, which was adapted to the experimental conditions found in the literature [21]. In this way, acetic anhydride is preserved as an acylating agent and pyridine as a catalyst.

The product obtained (Q5), a yellow solid, was characterized featuring melting points in the range of 178–186 °C, compatible with the literature data [18]. Additionally, the com-

comparative analysis of the FTIR between quercetin and the product demonstrated the absence of absorption bands in 3400 cm^{-1} characteristic of quercetin hydroxyls and by the appearance of bands around $1600\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ indicative of carbonyl ester, demonstrating the replacement of hydroxyl groups by acetyl groups: IR (KBr) ν (cm^{-1}): 1761, 1652, 1615, 1505, 1442, 1377, 1208, 1176, 1121, 1085, 1012, 892, 837, 691 and 600 (Figure 1). The spectra were comparable with those described in the literature [21].

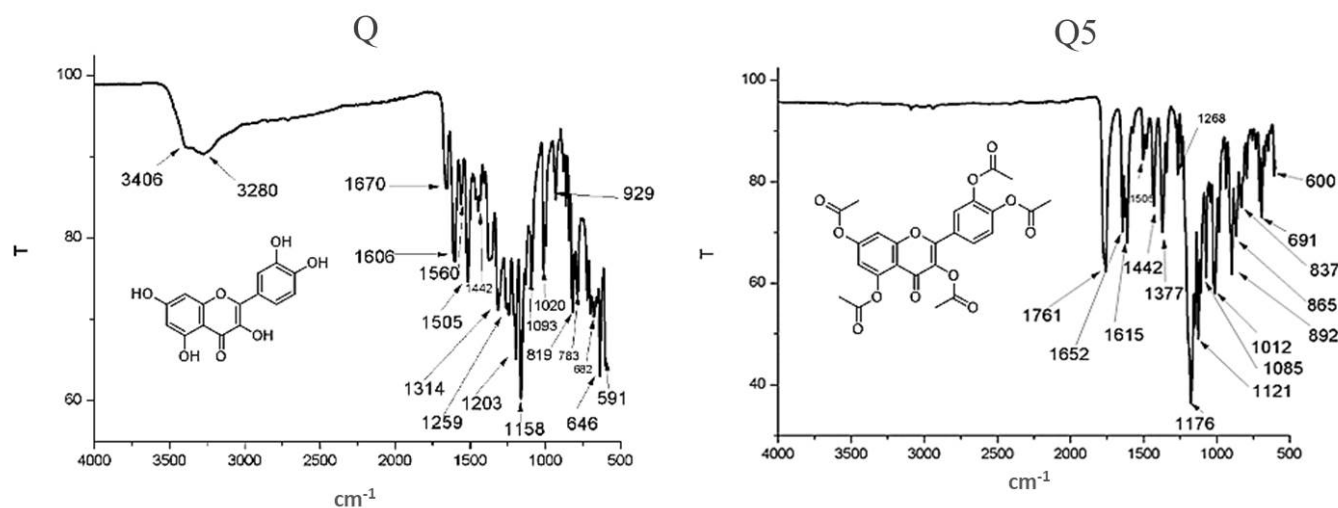


Figure 1. FTIR spectrum of the compounds Quercetin (Q) and Quercetin pentaacetate (Q5), demonstrating the disappearance of representative hydroxyl bands next to 3280 cm^{-1} and the appearance of bands close to 1761 cm^{-1} assigned to acetyl groups.

Nuclear magnetic resonance (NMR) analyses of the quercetin (Q) and product obtained (Q5) showed total acetylation, with the disappearance of singlets characteristic of hydroxyls above 9 ppm in the ^1H NMR spectrum (Supplemental Figures S1, S2 and S4–S6) and the appearance of large and characteristic signals of methyl in the aliphatic regions of the spectrum, between 2 and 3 ppm. For the ^{13}C NMR spectrum (Supplemental Figures S3 and S7–S9), the product obtained showed an increase in the representative signals of the ester carbonyls close to 170 ppm and the arising of signals between 20 and 21 ppm corresponding to the chemical shifts of the five aliphatic carbons of methyls, verified through the integral of the signals. The spectra were comparable with those described in the literature [22].

Biasutto et al. [23] were pioneers in the investigation of precursors based on esters, in order to increase the bioavailability of quercetin. Based on their studies, Mattarei et al. [21] promoted the total acetylation of quercetin and obtained the Q5 derivative in high yield (79–97%). More recently, Mohajeri et al. [24] obtained a yield of 85% in obtaining analogue Q5, under heating ($180\text{ }^\circ\text{C}$ for 6 h). In the present study, the synthesis of Q5 was efficient, and we obtained one compound duly characterized according to the data described in the literature.

2.2. Antioxidant ABTS $^{\bullet+}$ Radical Activity

The comparative analysis of the antioxidant activity of Q and Q5 showed that quercetin (Q) was more active in scavenging the ABTS $^{\bullet+}$ radical than Q5 (29% and 18%, respectively), with IC_{50} values (in μM) of 188.850 ± 0.003 and 379.560 ± 0.004 for Q and Q5, respectively.

The antioxidant activity of flavonoids is directly related to their molecular structure. There are two mechanisms through which phenolic compounds can exert their antioxidant functions: hydrogen atom transfer and electron donation [25]. Quercetin's superior antioxidant activity can be attributed to the significant contribution of hydroxyls and their hydrogens, which are replaced by acetyls in Q5 analogue, thus, decreasing the capacity for hydrogen donation or free radical scavenging by synthetic molecules.

No data were found in the scientific literature reporting the antioxidant activity of the Q5 compound. Oh et al. [26] evaluated quercetin ester preparations and their antioxidant

activities, showing that quercetin had the highest radical scavenging activity among the tested samples. Therefore, the high contribution of the hydroxyl groups in the antioxidant activity of quercetin are essential [27].

2.3. Antileishmania Activity

In order to evaluate the activity of the compound (Q and Q5) against the promastigote forms of the two *Leishmania* species, the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated from the cell viability assay in axenic culture. For *Leishmania braziliensis*, Q and Q5 had IC₅₀ values > 100 µM when compared to amphotericin B (IC₅₀ 1.1 µM ± 0.1). In addition, the effects of Q5 on the promastigote forms of *L. amazonensis* were evaluated, and this compound exhibited a lower IC₅₀ value (75.1 ± 4.7 µM) for this species compared to *L. braziliensis*.

Tasdemir et al. [8] compared the antitrypanosome and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues (derived from quercetin) and found them to be potent and effective antiprotozoal agents against amastigote forms of *L. donovani* (IC₅₀ = 1.0 µg mL⁻¹). For promastigote forms of *L. amazonensis*, Fonseca and Silva et al. [27] found IC₅₀ = 31.4 µM in cultures treated with quercetin within 48 h. Furthermore, they reported complete cell growth arrest with 96 µM quercetin in 96 h, demonstrating satisfactory antileishmanicidal activity. Cataneo et al. [28] evaluated the antipromastigote effect of quercetin (up to 192 µM) against *L. brasiliensis*, in peritoneal cells of macrophages. In promastigote cultures of *L. major*, quercetin and its analogue quercetin-pentaacetate showed a concentration-dependent effect (IC₅₀ = 2.5 ± 0.92 and 2.85 ± 0.99 µM, respectively [24].

Some authors have shown that quercetin induces death in *L. amazonensis* promastigotes through mitochondrial membrane dysfunction resulting from the production of reactive oxygen species [27,28] and other targets, such as arginase [7], ribonucleotide reductase [8,29] and topoisomerase II [30]. The results obtained in this study indicate that other tests should be considered in perspective for the tested compounds (Q and Q5), considering *in silico* tests for the investigation of targets that may be involved in the observed death mechanisms.

2.4. Anti-Inflammatory and Cytotoxicity Activities

Then, we focused on evaluating the biological activity of the novel derivative. First, non-toxic concentrations of Q and Q5 were determined in peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice. The CC₅₀ values did not demonstrate cytotoxicity at concentrations equal to or less than 80 µM (Figure 2A,D). Dexamethasone was not cytotoxic at the concentration tested (20 µM). Based on this, subsequent tests were carried out at concentrations not exceeding 80 µM.

The immunomodulatory activity of Q and Q5 was investigated to determine the effects of compounds on proinflammatory mediator secretion. The immunomodulatory effects of the compounds (Q and Q5) were initially evaluated in cultures of peritoneal macrophages through the production of nitric oxide. As expected, macrophage activation with LPS PLUS IFNγ increased the amount of nitrite production (Figure 2B,E). Treatment with quercetin inhibited, in a concentration-dependent manner, the production of nitrite ($p < 0.05$).

The pentaacetyl compound (Q5) did not demonstrate similar activity at 20 µM. Interestingly, the activity was significant at the highest concentrations tested (40 and 80 µM), for both compounds. At the highest concentration tested (80 µM), the effects of the compounds were similar to those observed in cultures of activated macrophages and treated with 20 µM dexamethasone. The compounds were not cytotoxic for peritoneal macrophages at the tested concentrations (20, 40 and 80 µM).

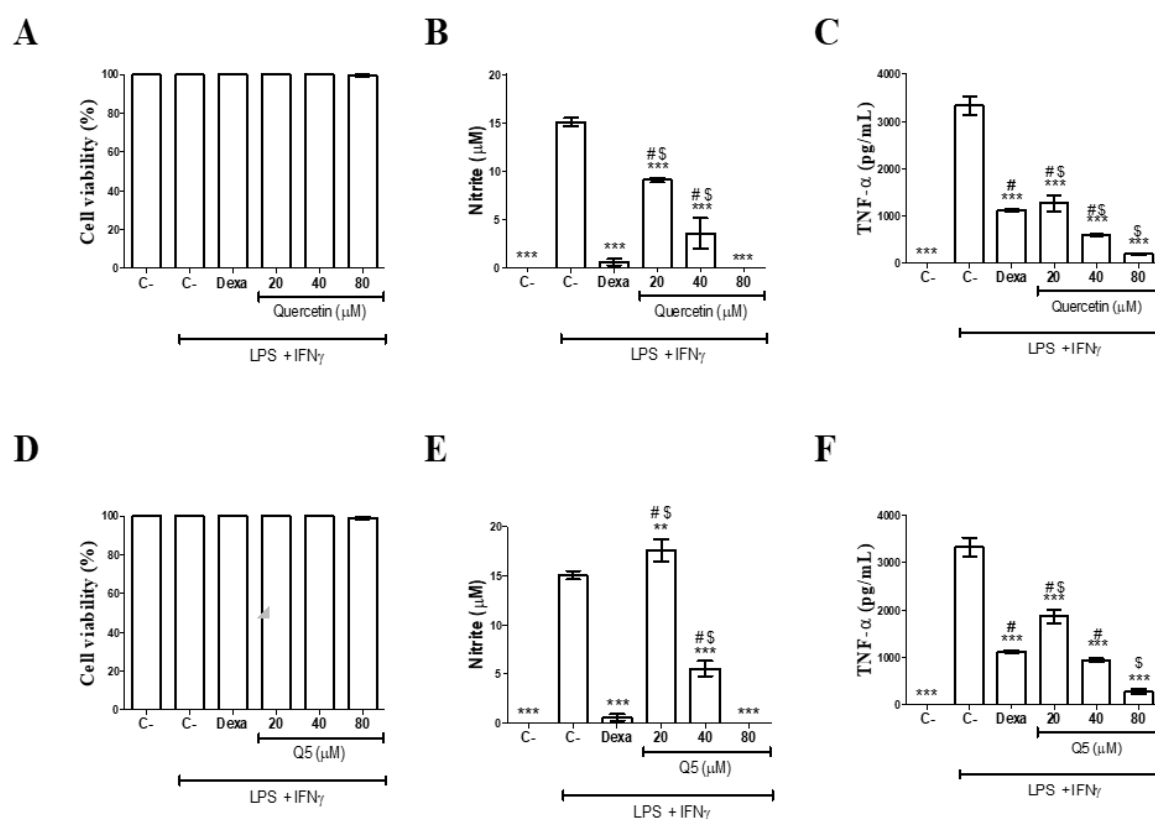


Figure 2. Effects of quercetin (Q) and quercetin-penta acetate analogue (Q5) on macrophages (in vitro). Peritoneal exudate macrophages stimulated or not with LPS + IFN γ were cultured in the presence or absence of compounds (20, 40 or 80 μ M) or dexamethasone (20 μ M). Cell viability was determined by the Alamar Blue method (A,D). Cell supernatant was collected after 24 h for nitrite quantification (B,E) or 4 h for TNF measurement (C,F). C- Group of untreated and unstimulated cells. C- Group of cells stimulated with LPS + IFN γ . Values are represented by the mean $\pm$ standard deviation of the mean of nine determinations obtained from three independent experiments. *** $p < 0.001$ compared to stimulated and untreated cells, ** $p < 0.01$ compared to stimulated and untreated cells, # $p < 0.05$ compared to unstimulated and untreated cells and \$ $p < 0.05$ compared to cells treated with dexamethasone.

For a better characterization of the anti-inflammatory effect of the compounds (Q and Q5), the inflammatory cytokine TNF was quantified by the Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) method. Macrophage stimulation using LPS + IFN- γ induced a prominent increase in TNF production. Treatment with Q and Q5 significantly reduced the production of TNF ($p < 0.05$) in a concentration-dependent manner (Figure 2C,F).

The reduction of inflammatory factors by quercetin is diversely described, including modulation for Th-2 inflammatory profiles, related to protection in neural diseases [31,32]. The anti-inflammatory action of quercetin is well described in the literature [33,34]. However, there are few studies that demonstrate the anti-inflammatory potential of the Q5 analogue. This study corroborates the findings of Chen et al. [35], who evidenced the role of Q and Q5 in the inhibition of the NO production induced by LPS, in a concentration-dependent manner without deleterious cytotoxic effects for the RAW 264.7 macrophage lineage. Furthermore, this study demonstrated the unprecedented effect of Q5 in inhibiting the pro-inflammatory cytokine TNF.

The data obtained indicate the conservation of the effects on the semi-synthetic molecule (Q5); however, the dosage of other factors, such as the cytokine IL-10, can be a perspective in the evaluation of these profiles. Therefore, Q5 can be considered a potential molecule for future in vitro and in vivo tests aiming at an additional therapeutic alternative with anti-inflammatory activity.

The cytotoxicity of the tested compounds (Q and Q5) was evaluated at 20, 40 and 80 μ M using the AlamarBlue colorimetric method in a healthy cell line (MRC-5, human lung

fibroblasts) and in two different cancer cell lines, HepG2 (human hepatocellular carcinoma) and HL-60 (human promyelocytic leukemia), as shown in Figure 3. Doxorubicin was the standard drug used as a positive control.

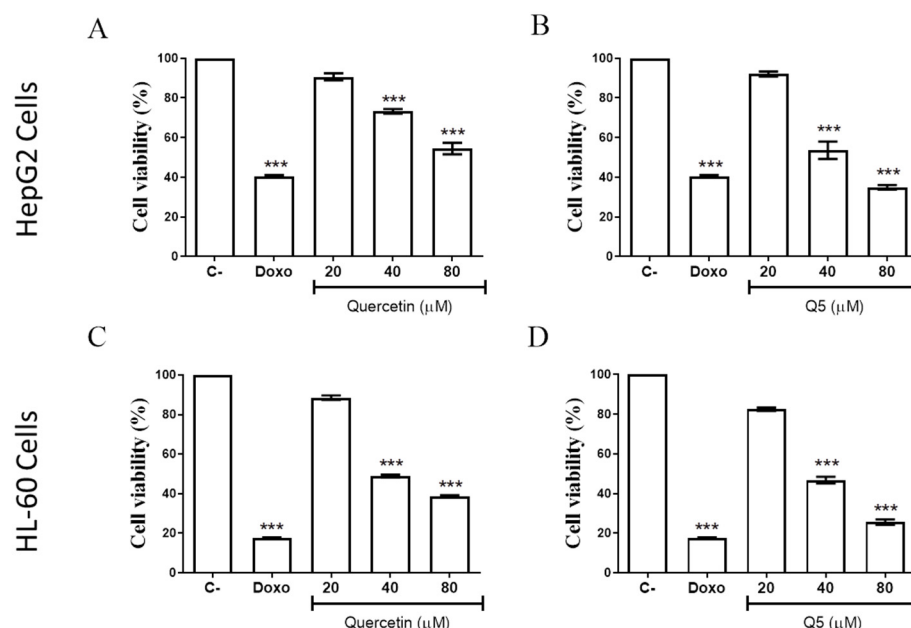


Figure 3. Effects of quercetin (Q) and the quercetin-pentaacetate analogue (Q5) on the viability of HepG2 (A,B) and HL-60 (C,D) cells (20, 40 and 80 µM) or doxorubicin (5 µM) as determined by AlamarBlue after 72 h of treatment. Values are represented as the mean $\pm$ SD of three independent experiments performed in triplicate. *** $p < 0.001$ compared to untreated cells.

As shown in Figure 3, for HepG2 cells, quercetin (Q) did not show significant cytotoxic activity at the highest concentration investigated (80 µM), and its pentaacetate analogue (Q5) showed reduced activity ($IC_{50} = 53.9$ µM). For the HL-60 cancer cell line, quercetin was shown to be not very active ($IC_{50} = 51.3$ µM); however, interestingly, Q5 was significantly more active than quercetin with an IC_{50} of 33.6 µM. The standard drug doxorubicin had IC_{50} values ranging from 0.1 to 0.2 µM for cancer cell lines showing significant cytotoxic effects against the healthy cell line MRC-5 (Table 1), which was not seen for the compounds (Q and Q5).

Table 1. Cytotoxicity of the compounds Quercetin (Q) and Quercetin penta-acetate (Q5) against the healthy cell line MRC-5 (human lung fibroblasts) and different cancer cell lines: HepG2 (human hepatocellular carcinoma), HL-60 (human promyelocytic leukemia) and C6 (rat glioma).

	Tested Compounds (IC_{50} µM)		
	Quercetin (Q)	Q5	Doxorubicin
Cancer cells			
IC_{50} (µM) ^a HL-60	51.3 (± 0.4)	33.6 (± 2.6)	0.2 (± 0.0)
IC_{50} (µM) ^b HepG2	>80	53.9 (± 11.3)	0.1 (± 0.0)
Non-cancer cells			
CC_{50} MRC-5	>80	>80	0.9 (± 0.0)

^a Determined in HL-60 incubated with compounds for 72 h; ^b determined in HepG2 incubated with compounds for 72 h. Values represented as the mean $\pm$ SD and were calculated using three independent experiments. CC_{50} = 50% cytotoxic concentration. IC_{50} = 50% inhibitory concentration.

For the HL-60 cell line, the Q and Q5 presented values of 51.3 and 33.6 µM, respectively, in agreement with Massi et al. [17]. Regarding cytotoxicity in non-tumor cells, Q and Q5 presented IC_{50} values >80 µM, showing a selective profile against the cancer cell line. Few studies have demonstrated the activity of the quercetin Q5 analogue in cancer cell

lines. However, Q5 activity in a HeLa tumor cell lineage was documented by Danihelová et al. [22], which showed that acetylated esters of quercetin were the most effective cytotoxic derivatives. No data were found on the cytotoxic role of Q5 in HepG2 lineage cells. Only one study was found in the literature revealing that the tetra-acetylated analogue of quercetin had a significant effect on the inhibition of HL-60 lineage cells through the activation of caspase-3, promoting apoptosis [36].

A colorimetric method MTT assay was used to access the cytotoxicity in C6 cell culture. Quercetin and Q5 induced a decrease in 570 nm MTT absorbance that represents mitochondrial dehydrogenase activity and suggests a decrease in the cell viability in C6 cells. As revealed in Figure 4, quercetin-induced cytotoxicity in C6 cells in concentrations higher than 25 μM for 72 h (Figure 4A), while 0.78 μM of Q5 for 72 h was able to decrease cell viability (Figure 4B). It was observed that 50 μM quercetin (Q) and Q5 decreased the cell viability to $41.3\% \pm 2.9\%$ and $47.5\% \pm 1.2\%$, respectively, when compared with the control group ($100.0\% \pm 6.4\%$) (Figure 4A,B). No significant changes in cell viability were visualized in C6 cultures treated with DMSO (0.05%), when compared with untreated cells.

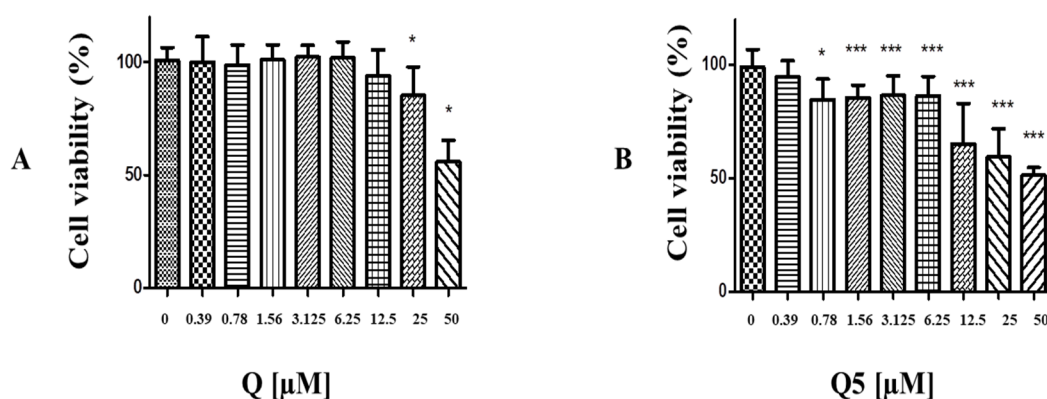


Figure 4. Analysis of cytotoxic activity by MTT test in C6 cells exposed to Q and Q5 compound at concentrations of 50 μM and 7 1:2 dilutions. (A) C6 after 72 h of exposure to quercetin. (B) C6 after 72 h of exposure to quercetin pentaacetate (Q5). Cells under control conditions were treated with 0.05% DMSO—a vehicle for drug dilution. The results expressed as a percentage in relation to the control, taken as 100% (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$). The different patterns of the column chart represent different concentrations of quercetin (Q) in (A), and quercetin pentaacetate (Q5) in (B).

Based on the results obtained, we then investigated the morphological effects of compounds Q and Q5 (50 μM) on the C6 cells, at 24, 48 and 72 h of the treatment, using optical microscopy. Quercetin pentaacetate (Q5) at 50 μM induced changes in the morphology of C6 glioma cells within the first 24 h, with a visible reduction in cytoplasmic prolongations when compared to the control group (Figure 5). After 48 h of treatment with Q5, the cells assumed a rounded morphology characterized by retraction of the cell body and shapeless membrane (which was not reported in the scientific literature), unlike quercetin, which, during this time of treatment, presented a morphological aspect similar to fibroblasts [37]. Any other morphological changes were visualized in cells under other treatment conditions.

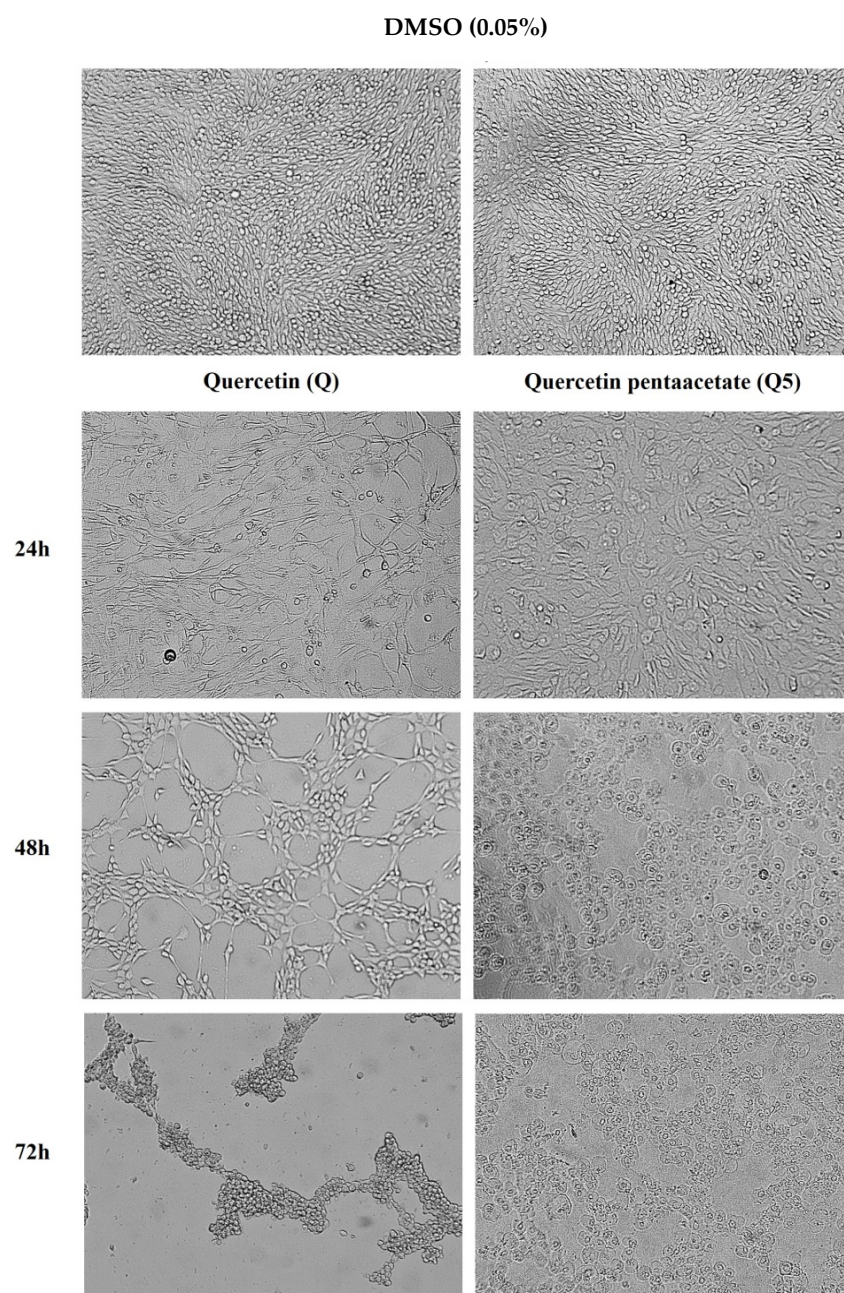


Figure 5. Morphological changes of C6 cells under control conditions (0.05% DMSO), after 24, 48 and 72 h of exposure to 50 μ M of quercetin (Q) or quercetin-pentaacetate (Q50) compounds.

The hydroxyl substitution by the acetyl groups may promote improved cellular absorption of the quercetin analogues favoring various biological tests, particularly in cancer cells [38,39]. Bispo da Silva et al. [40] demonstrated, by treating C6 cells with the flavonoids rutin and quercetin, a significant reduction in the proportion of adherent C6 cells, with a thinner and bipolar morphological phenotype, compared to control cultures. Treatment of C6 cells with flavonoids inhibited the migratory properties of viable C6 cells after 24 h of treatment. In control conditions, microglia presented a rounder phenotype; after rutin treatment, more than 50% of cells acquired a branched, multipolar phenotype, and the others acquired the amoeboid phenotype, both indicating activation.

Studies indicate that quercetin interferes in the regulation of cell signaling transduction pathways associated with cell death by apoptosis and in the stages of cell cycle progression [41,42]. Santos et al. [14] indicated a potential reduction in the growth of

GL-15 human glioblastoma cells. Bi et al. [43] visualized an induction of autophagy of U87 and U251 human glioblastoma cells in a dose-dependent manner.

The results obtained corroborate with Danihelova et al. [22], in which the acetyl groups inserted in the quercetin molecule promoted an improvement in anticancer activity. Furthermore, they indicated a greater tropism for cancer cells, particularly for cells of neural lineages. This study is unprecedented in relation to the Q5 analogue in the treatment of C6 glioma cells. Dell’Albani et al. [44] showed a better action of acyl derivatives of quercetin in cultures of human glioma strains U373-MG and murine glioma 9L, indicating pathways of death by apoptosis. The modification of cell morphology to a rounded profile can refer to death mechanisms, such as apoptosis, widely attributed to quercetin [45–47]. In future perspectives, tests with healthy neural cells may help to elucidate this hypothesis.

3. Materials and Methods

3.1. Reagents and Materials

All reagents (quercetin, pyridine, acetic anhydride, tricoloroisocyanuric acid, dichloro methane, 2,4-dinitro-phenylhydrazine, hydroxylamine hydrochloride, sodium acetate, petroleum ether, sulfuric acid, potassium persulfate and nitrate) were analytical grade and commercially available (Quimex[®], Merck, Brazil and Sigma Aldrich[®], St. Louis, MO, USA). For the preparation of all standard solutions and samples, ultrapure water (with resistivity $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtained from the Milli-Q Pluswater purification system (Millipore, Molsheim, France) was used. All laboratory glassware was washed in a 10% (*v/v*) HNO_3 solution for 24 h, rinsed with high-purity water and dried at ambient temperature.

3.2. Synthesis and Characterization

The structural analog was obtained after quercetin molecular modification from the more accessible and reproducible synthetic route (penta acetylation). We applied the green chemistry principles with minimization of substance use. The pentaacetyl analog (Q5) was obtained after the molecular modification of quercetin, from a synthetic route, which uses acetic anhydride as an acylating agent and pyridine as a catalyst.

The mixture containing quercetin (300 mg, 1 eq.), acetic anhydride (0.80 mL, 20 eq.) and pyridine (7.5 mL) was kept under magnetic stirring at room temperature. After 24 h of stirring, 250 mL of dichloromethane was added to the reaction medium. Then, the reaction was washed with 10% HCl ($3 \times 100 \text{ mL}$), diluted NaOH ($3 \times 50 \text{ mL}$) and water ($3 \times 100 \text{ mL}$); dried over anhydrous sodium sulfate; filtered; and evaporated, in the rotary evaporator (Fisatom, Minas Gerais, Brazil) [21]. The amount of Q5 and the yield obtained were 280 mg and 54%, respectively.

The structural modification reaction of the quercetin molecule was monitored by thin layer chromatography (TLC) using a mixture of hexane and ethyl acetate (1:1) as solvents. For the physicochemical characterization, the melting point was used. Fourier Transform Infrared (FTIR) tests by the Attenuated Total Reflection (ATR) method were performed by a FTIR Spectrum 100S model (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), with the acquisition of the scanning spectra in the mid-infrared (4000 to 600 cm^{-1}).

The sample (mass $\sim 5.0 \text{ mg}$) was placed on the ATR crystal and subjected to a pressure of approximately 20 N with the aid of a manual mechanical press. FTIR spectra were traced by OriginPro8 software, OriginLAB[®] (www.originlab.com, accessed in 10 September 2021). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra were recorded in a Bruker Avance III 500 MHz (Uster, Switzerland) spectrometer-500 MHz for ^1H NMR and 125 MHz for ^{13}C NMR, using DMSO as a solvent. Chemical shifts were expressed in the ppm scale ($\mu\text{g/mL}$), and chloroform (CHCl_3) was used as the internal reference.

NMR spectra were processed by TopSpin[®] 4.0 software (Bruker Biospin, Coventry, UK) and compared with literature data [38]. The NMR data were: ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 2.34 (6 H, s, $-\text{OCOCH}_3$); 2.35 (3 H, s, $-\text{OCOCH}_3$); 2.35 (3 H, s, $-\text{OCOCH}_3$); 2.44 (3 H, s, $-\text{OCOCH}_3$); 6.88 (1 H, d, $J = 2.5 \text{ Hz}$); 7.34 (1 H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$); 7.36 (1 H, d, $J = 8.5$); 7.70 (1 H d, $J = 2.0 \text{ Hz}$); 7.73 (1H, dd, $J_1 = 8.5 \text{ Hz}$, $J_2 = 2.0 \text{ Hz}$); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ

170.04; 169.24; 167.86; 167.79; 156.87; 154.28; 150.43; 144.40; 142.22; 127.78; 126.42; 124.01; 123.93; 123.85; 113.89; 108.96; 21.16; 21.02; 20.65; and 20.49.

3.3. Antioxidant ABTS^{•+} Radical Activity

The ABTS^{•+} sequestration activity was adapted from the method described by Dorman and Hiltunen [48]. Potassium persulfate and ABTS (Sigma Aldrich[®], St. Louis, MO) were dissolved in distilled water to form a final concentration of 2.45 mM and 7 mM, respectively. The ABTS^{•+} solution was produced by adding both solutions at a rate of 1:1, and then the solution was incubated at room temperature for 16 h in the dark.

The resulting solution, intensely colored, was adjusted with ethanol, in the spectrophotometer, to an absorbance of 0.7 ± 0.05 nm at 734 nm before use. We used 30 μ L of the samples, or Trolox (Sigma Aldrich[®], St. Louis, MO), as a reference standard at different concentrations (5, 10, 25, 50, 75 and 100 μ M), were added to 3 mL of the ABTS^{•+} solution and awaited to reacts for 6 min. The absorbance was measured at 734 nm against a blank (ethanol). The ABTS^{•+} scavenging capacity was calculated as:

$$\text{ABTS}^{\bullet+} \text{ scavenging effect (\%)} = (1 - A_0/A_1) \times 100;$$

where A0 is the absorbance of the control, and A1 is the absorbance of the sample or standard. All determinations were performed in triplicate. IC₅₀ values were calculated and expressed as the mean $\pm$ SD in μ M.

3.4. Antileishmania Activity

L. amazonensis (MHOM/BR88/BA-125 Leila strain) and *L. braziliensis* (MHOM/BR88/BA-3456) promastigotes (1×10^6 per well) were cultured in a 96-well plate in Schneider medium (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO) and 50 μ g mL⁻¹ gentamicin (Life, Carlsbad, CA, USA) and subjected to treatment with different concentrations (100 μ M; six dilutions 1:2) of Q5. The parasites were incubated for 72 h at 26 °C. Then, 20 μ L/well of AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was added over 2 h. The reading was carried out in a spectrophotometer using the wavelengths of 570 and 600 nm. The calculation of axenic culture inhibition was determined based on the untreated control [49].

3.5. Anti-Inflammatory and Cytotoxicity Activities

3.5.1. Drugs

Dexamethasone (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA), a synthetic glucocorticoid, was used as positive control in immunomodulatory assays. Doxorubicin (doxorubicin hydrochloride, Laboratory IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina) was used as a reference anticancer drug. All compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; PanReac, Barcelona, Spain) and diluted in cell culture medium for use in the assays. The final concentration of DMSO was less than 1% in all experiments.

3.5.2. Animals

BALB/c mice, aged 4–10 weeks, were provided by the vivarium of Gonçalo Moniz Institute/FIOCRUZ-BA (IGM, Salvador, Bahia, Brazil) where they were kept in cages containing a maximum of five mice. All cages were kept in an acclimatized room at $21 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, on a 12-h light/dark cycle, with water and food ad libitum throughout the experimental period. The experiments with animals were approved by the Ethics and Animal Use Committee of Gonçalo Moniz/FIOCRUZ-BA Institute (IGM-018/15).

3.5.3. Cells

HL-60 (human acute promyelocytic leukemia) and HepG2 (human hepatocellular carcinoma) were obtained from the American Type Culture Collection—ATCC (Rocville, ML, USA), were used. To assess the selectivity of quercetin (Q) and the Q5 derivative on the proliferation of non-cancer cells, the MRC-5 lineage (human lung fibroblast), also obtained

from ATCC, was used. Cell lines were grown in cell culture bottles (75 cm³, 250 mL volume) using RPMI 1640 culture medium (Gibco™) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco™) and 50 µg/mL gentamicin (Gibco™). The cells were kept in incubators with an atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C and monitored daily. All cell lines were tested for mycoplasma using a Hoechst staining mycoplasma detection kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

C6 cell line was derived from rat glial tumors induced by *n*-nitrosomethylurea [50]. This glioma cells were cultured as described by de Oliveira et al. [51]. The cells were incubated at 37 °C in a humidified incubator at 5% CO₂. C6 cells were grown on cell culture dishes (100-mm Ø, TPP) in DMEM medium supplemented with 100 UI/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin, 7 mM glucose, 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate and 10% fetal calf serum. The culture medium was changed every 2 days. Twenty-four hours prior to treatments, C6 cells were seeded in Petri dishes of 35 mm in diameter or 96-well plates at a density of 3.5×10^4 cells/well.

All cell lines were tested for mycoplasma using the Mycoplasma Stain Kit (Sigma-Aldrich) to validate the use of cells free from contamination. The cell lines information is contained in the database “Cell Bank of Rio de Janeiro (BCRJ)”: HepG2 cell (Code: 0291), HL-60 cell (Code: 0104) and C6 cell (Code: 0057).

3.5.4. Cytotoxic Activity Assay

To assess the cytotoxicity of the tested compounds (Q and Q5) on the HL-60 (human acute promyelocytic leukemia) and HepG2 cells, the colorimetric method of Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used. Alamar Blue (resazurin) is an indicator that produces a colorimetric change and a fluorescent signal in response to metabolic activity. Resazurin is reduced to resorufin by metabolically active cells. The oxidized form is blue (non-fluorescent/non-viable cell), and the reduced form is pink (fluorescent/viable cell). The reduction of resazurin to resorufin reflects the cell viability [52].

In the assay, cells were distributed in 96-well plates at a predefined density of 0.3×10^6 cells/mL for cells of the HL-60 lineage and 0.7×10^5 cells/mL for cells of the HepG2 lineage. The compounds were added in a series of eight concentrations (80 to 0.62 µM), with the exception of doxorubicin, which was used in concentrations ranging from 0.003 to 5 µM. The negative control received the same amount of DMSO (0.025%). The plates were incubated for 72 h in an oven at 37 °C and 5% CO₂. After this period, 20 µL/well of Alamar Blue was added, and the plates were incubated for another 4 h. The plates were read using a spectrophotometer (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), at wavelengths of 570 and 600 nm.

The C6 cell viability was determined using the colorimetric method described by Hansen et al. [53]. The MTT (3–4,5-dimethylthiazol-2-yl, 2,5-diphenyltetrazolium bromide) was dissolved at a concentration of 5 mg/mL in sterile phosphate buffered saline (PBS) at room temperature, and the solution was further sterilized by passing through a 0.2-mm filter and stored at 4 °C in the dark. In the assay, cells were distributed in 96-well plates at a predefined density of 3.5×10^4 cells/mL for the C6 cell lineage. The compounds were added in a series of eight concentrations (80 to 0.39 µM).

MTT was added in each well at a final concentration of 2 mg/mL, and the cells were incubated for 2 h. After that, cells were lysed with 20% (*w/v*) sodium dodecyl sulfate (SDS) and 50% (*v/v*) dimethylformamide (DMF) solution (pH 4.7), in an overnight incubation at room temperature [54,55]. The absorbance was measured with a spectrophotometer microplate reader (570 nm), Thermo Scientific® Flash Varioskan (Version 3001, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland). Eight replicates were used for each concentration. Cell viability was expressed as the percentage of absorbance at 570 nm, and the control was adopted as 100%. After treatments, cell morphology was evaluated by light microscopy using an optic microscope (Eclipse TS100 inverted microscope, Nikon Instruments, Tokyo, Japan) and photographed using a digital camera (Coolpix S4300, Nikon Instruments, Tokyo, Japan).

3.5.5. Macrophage Culture

Peritoneal exudate macrophages (2×10^5 cells/well) were incubated in 96-well plates in DMEM medium supplemented with 10% PBS and 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamicin, in triplicate, stimulated or not with LPS (500 ng/mL) and IFN- γ (5 ng/mL) and treated or not with different concentrations of compounds (20, 40 and 80 μM). The cells were kept in an incubator at 37 °C and 5% CO₂ for 4 and 24 h. After this period, the culture supernatants were collected for cytokines and nitric oxide dosage. In some assays, to assess the cytotoxicity, the supernatant was replaced with medium plus 10% Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and the plates were incubated for an additional 4 h. The spectrophotometer reading was performed at 570 and 600 nm.

3.5.6. TNF Dosage

TNF measurement was performed from cell culture supernatants, using the sandwich ELISA technique, using Development System kits DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MI, USA), according to the manufacturer's recommendations. ELISA plates (NUNC—IMMUNO PLATE Maxisorp Surface) were sensitized with 50 μL /well of the capture antibody, at a concentration of 2 $\mu\text{g/mL}$, diluted in PBS 1 x and incubated for 16 h at 4 °C. The plates were washed three times with 1 $\times$ PBS/0.05% tween 20 and blocked with 100 μL /well of 1 $\times$ PBS and 0.05% tween 20 and 0.1% bovine albumin for 2 h.

Then, 50 μL /well of samples, blank and standard curve of recombinants diluted in Tris-saline buffer (20 mM Tris in the base and 150 mM NaCl) containing 0.1% bovine albumin and 0.05% tween 20 were added for 2 h at room temperature. The standard was serially diluted (1:2), from the initial concentration of 2000 pg/mL, with 11 duplicate dilutions. The plate was washed three times with PBS/0.05% tween and incubated with 50 μL of the detection antibody (biotinylated) at a concentration of 400 ng/mL for a period of 2 h.

The plate was washed three times with PBS/0.05% tween and incubated for 20 min with avidin-peroxidase diluted 1:200. The development was carried out by adding TMB substrate (Thermo Fisher) and interrupted with 0.05 M phosphoric acid. The reading of the reaction was determined using a spectrophotometer (Spectramax) (Molecular Devices, San Jose, CA, USA), with a 450 nm filter. Analyses were performed using the Softmax 4.3.1 Software (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

3.5.7. Nitric Oxide Dosage

The production of nitrite in macrophage supernatants was estimated through the quantification of its oxidative product, nitrite, by the Griess method [50]. The absorbance was determined in a spectrophotometer (Spectramax) (Molecular Devices, San Jose, CA, USA), with a 570 nm filter. Analyses were performed using Softmax Software 4.3.1 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA), and the results were expressed in μM of nitrite, based on a standard curve of sodium nitrite with an initial concentration of 400 μM .

3.6. Statistical Analysis

The one-way ANOVA test followed by the Bonferroni multiple comparison post-test was used to determine the statistical significance of the comparisons between groups in the studies. The results were considered statistically significant when $p < 0.05$. All analyses were performed using the GraphPad Prism version 5.01 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. Conclusions

The conditions and reactions synthesis media of quercetin analogues showed efficiency in obtaining one compound duly characterized, according to the data described in the literature. The comparative analysis of the antioxidant activity of Q and Q5 showed that quercetin (Q) was more active in scavenging the ABTS $^{\bullet+}$ radical than Q5 (29% and 18%, respectively). The reduced antioxidant potential did not demonstrate interference

in immunomodulatory and antitumoral activities. The chemical modifications proposed in this study enhanced the antiproliferative effect and maintained the anti-inflammatory activity but not cytotoxicity activity in healthy tested cells.

The acetylated derivative (Q5) present improved the cytotoxicity in cancer hepatocellular cells (HepG2), promyelocytic leukemia (LH-60) cells and, particularly, in glioma (C6) cells. The rat glioma C6 cells treated showed a morphological unprecedented pattern of cell death. Q5 at 50 μ M for 24 h induced changes in C6 glioma cell morphology characterized by a round body shape (which was not reported in the scientific literature), unlike quercetin, which presented a fibroblast-like morphology.

Further investigations need to be done to better understand the effects of acetylated derivatives of quercetin, particularly in neuronal cells. This study allowed, for the first time, the application of structurally modified quercetin in neural cells for potential neuro-protective effects.

Supplementary Materials: The following are available online. Figures/Analysis by ^1H and ^{13}C NMR. Figure S1: Complete ^1H NMR spectrum of Quercetin (Q); Figure S2: Expansion of Quercetin (Q) ^1H NMR Spectrum; Figure S3: Complete ^{13}C NMR spectrum of Quercetin (Q); Figure S4: Complete ^1H NMR spectrum of the obtained compound—Quercetin pentaacetate analogue (Q5); Figure S5: Expansion of the ^1H NMR spectrum of the obtained compound—Quercetin pentaacetate analogue (Q5); Figure S6: Expansion of the more aliphatic region of the ^1H NMR spectrum of the obtained compound—Quercetin pentaacetate analogue (Q5); Figure S7: Complete ^{13}C NMR spectrum of the obtained compound—Quercetin pentaacetate analogue (Q5); Figure S8: Expansion of the ^{13}C NMR spectrum of the obtained compound—Quercetin pentaacetate analogue (Q5); Figure S9: Expansion of the aliphatic region of the ^{13}C NMR spectrum of the obtained compound—Quercetin pentaacetate analogue (Q5).

Author Contributions: Conceptualization, A.d.F.S.J., L.L.B.d.S., C.S.M. and V.D.A.d.S.; validation, A.d.F.S.J., L.L.B.d.S., C.S.M., M.B.P.S., E.T.G., V.D.A.d.S. and S.L.C.; data curation, A.d.F.S.J., C.S.M. and V.D.A.d.S.; formal analysis, S.V.S.d.S., O.M.B., J.T.S., É.N.S., C.C.d.S., T.B.d.S.M., L.V.P. and I.P.S.; investigation, A.d.F.S.J., L.L.B.d.S., C.S.M., V.D.A.d.S. and S.V.S.d.S.; writing—original draft preparation, A.d.F.S.J., L.L.B.d.S., C.S.M., V.D.A.d.S. and S.V.S.d.S.; writing—review and editing, A.d.F.S.J. and S.V.S.d.S.; visualization and supervision, A.d.F.S.J., L.L.B.d.S., C.S.M. and V.D.A.d.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics and Animal Use Committee of Gonçalo Moniz/FIOCRUZ-BA Institute (IGM-018/15).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors are grateful for the financial support received (fellowships) from “Coordenação de Aperfeioamento de Pessoal de Nvel Superior—Brasil (CAPES)”, “Fundaao de Amparo  Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)” and “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)”; for collaborations of the State University of Bahia (UNEB); Gonçalo Moniz Institute, Fiocruz/Bahia; Federal University of Bahia (UFBA) and Research Group: “Biopharmaceutics and Drugs”.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

References

1. Formica, J.V.; Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **1995**, *33*, 1061–1080. [[CrossRef](#)]
2. Materska, M. Quercetin and its derivatives: Chemical structure and bioactivity—A review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2008**, *58*, 407–413.
3. Wang, T.Y.; Li, Q.; Bi, K.S. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J. Pharm. Sci.* **2018**, *13*, 12–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. D'Andrea, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* **2015**, *106*, 256–271. [[CrossRef](#)]
5. Araújo, M.V.; Queiroz, A.C.; Silva, J.F.M.; Silva, A.E.; Silva, J.K.S.; Silva, G.R.; Silva, E.C.O.; Souza, S.T.; Fonseca, E.J.S.; Camara, C.A.; et al. Flavonoids induce cell death in: *Leishmania amazonensis*: In vitro characterization by flow cytometry and Raman spectroscopy. *Analyst* **2019**, *144*, 5232–5244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Faixová, D.; Hřčková, G.; Kubašková, T.M.; Mudroňová, D. Antiparasitic effects of selected isoflavones on flatworms. *Helminthologia* **2021**, *58*, 1–16. [[CrossRef](#)]
7. Manjolin, L.C.; Reis, M.B.G.; Maquiaveli, C.C.; Santos-Filho, O.A.; Silva, E.R. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Food Chem.* **2013**, *141*, 2253–2262. [[CrossRef](#)]
8. Tasdemir, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Yardley, V.; Schmidt, T.J.; Tosun, F.; Rüedi, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: In vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1352–1364. [[CrossRef](#)]
9. Lee, W.J.; Hsiao, M.; Chang, J.L.; Yang, S.F.; Tseng, T.H.; Cheng, C.W.; Chow, J.M.; Lin, K.H.; Lin, Y.W.; Liu, C.C.; et al. Quercetin induces mitochondrial-derived apoptosis via reactive oxygen species-mediated ERK activation in HL-60 leukemia cells and xenograft. *Arch. Toxicol.* **2015**, *89*, 1103–1117. [[CrossRef](#)]
10. Drummond, E.M.; Harbourn, N.; Marete, E.; Martyn, D.; Jacquier, J.; O'Riordan, D.; Gibney, E.R. Inhibition of proinflammatory biomarkers in THP1 macrophages by polyphenols derived from chamomile, meadowsweet and willow bark. *Phytother. Res.* **2013**, *27*, 588–594. [[CrossRef](#)]
11. Thon, N.; Thorsteinsdottir, J.; Eigenbrod, S.; Schüller, U.; Lutz, J.; Kreth, S.; Belka, C.; Tonn, J.C.; Niyazi, M.; Kreth, F.W. Outcome in unresectable glioblastoma: MGMT promoter methylation makes the difference. *J. Neurol.* **2016**, *264*, 350–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Perzelova, A.; Tardy, M. Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation. *Eur. J. Cancer* **2001**, *37*, 520–530.
13. Wang, G.; Wang, J.; Du, L.; Li, F. Effect and mechanism of total flavonoids extracted from *Cotinus coggygria* against Glioblastoma cancer in vitro and in vivo. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 856349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Santos, B.L.; Oliveira, M.N.; Coelho, P.L.C.; Pitanga, B.P.S.; Silva, A.B.; Adelita, T.; Silva, V.D.A.; Costa, M.F.D.; El-Bachá, R.S.; Tardy, M.; et al. Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. *Chem.-Biol. Interact.* **2015**, *242*, 123–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Farhadi, L.; Mohammadi-Motlagh, H.R.; Seyfi, P.; Mostafaie, A. Low concentrations of flavonoid-rich fraction of shallot extract induce delayed-type hypersensitivity and TH1 cytokine IFN γ expression in BALB/c mice. *Int. J. Mol. Cell. Med.* **2014**, *3*, 16–25.
16. Nair, M.P.N.; Kandaswami, C.; Mahajan, S.; Chadha, K.C.; Chawda, R.; Nair, H.; Kumar, N.; Nair, R.E.; Schwartz, S.A. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN γ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1593*, 29–36. [[CrossRef](#)]
17. Massi, A.; Bortolini, O.; Ragno, D.; Bernardi, T.; Sacchetti, G.; Tacchini, M.; De Risi, C. Research progress in the modification of quercetin leading to anticancer agents. *Molecules* **2017**, *22*, 1270. [[CrossRef](#)]
18. Foti, M.C.; Rocco, C. Unveiling the chemistry behind bromination of quercetin: The “violet chromogen”. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 1602–1607. [[CrossRef](#)]
19. Helgren, T.R.; Sciotti, R.J.; Lee, P.; Duffy, S.; Avery, V.M.; Igbinoba, O.; Akoto, M.; Hagen, T.J. The synthesis, antimalarial activity and CoMFA analysis of novel aminoalkylated quercetin analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 327–332. [[CrossRef](#)]
20. Özyürek, M.; Akpınar, D.; Bener, M.; Türkkan, B.; Güçlü, K.; Apak, R. Novel oxime based flavanone, naringin-oxime: Synthesis, characterization and screening for antioxidant activity. *Chem.-Biol. Interact.* **2014**, *212*, 40–46. [[CrossRef](#)]
21. Mattarei, A.; Biasutto, L.; Rastrelli, F.; Garbisa, S.; Marotta, E.; Zoratti, M.; Paradisi, C. Regioselective O-derivatization of quercetin via ester intermediates. An improved synthesis of rhamnetin and development of a new mitochondriotropic derivative. *Molecules* **2010**, *15*, 4722–4736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Danihelová, M.; Veverka, M.; Šturdík, E.; Jantová, S. Antioxidant action and cytotoxicity on HeLa and NIH-3T3 cells of new quercetin derivatives. *Interdiscip. Toxicol.* **2013**, *6*, 209–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Biasutto, L.; Marotta, E.; De Marchi, U.; Zoratti, M.; Paradisi, C. Ester-based precursors to increase the bioavailability of quercetin. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 241–253. [[CrossRef](#)]
24. Mohajeri, M.; Saghaei, L.; Ghanadian, M.; Saberi, S.; Pestechian, N.; Ostadhusseini, E. Synthesis and in vitro leishmanicidal activities of six quercetin derivatives. *Adv. Biomed. Res.* **2018**, *7*, 64. [[PubMed](#)]
25. Dehghan, G.; Khoshkam, Z. Tin(II)-quercetin complex: Synthesis, spectral characterisation and antioxidant activity. *Food Chem.* **2012**, *131*, 422–426. [[CrossRef](#)]
26. Oh, W.Y.; Ambigaipalan, P.; Shahidi, F. Quercetin and its ester derivatives inhibit oxidation of food, LDL and DNA. *Food Chem.* **2021**, *364*, 130394. [[CrossRef](#)]
27. Fonseca-Silva, F.; Inacio, J.D.F.; Canto-Cavaleiro, M.M.; Almeida-Amaral, E.E. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PLoS ONE* **2011**, *8*, e14666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Cataneo, A.H.D.; Tomiotto-Pellissier, F.; Miranda-Sapla, M.M.; Assolini, J.P.; Panis, C.; Kian, D.; Yamauchi, L.M.; Simão, A.N.C.; Casagrande, R.; Pinge-Filho, P.; et al. Quercetin promotes antipromastigote effect by increasing the ROS production and anti-amastigote by upregulating Nrf2/HO-1 expression, affecting iron availability. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *113*, 108745. [CrossRef]
29. Sen, G.; Mukhopadhyay, S.; Ray, M.; Biswas, T. Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *61*, 1066–1075. [CrossRef]
30. Mittra, B.; Saha, A.; Chowdhury, A.R.; Pal, C.; Mandal, S.; Mukhopadhyay, S.; Bandyopadhyay, S.; Majumder, H.K. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Mol. Med.* **2000**, *6*, 527–541. [CrossRef]
31. Suganthi, N.; Devi, K.P.; Nabavi, S.F.; Braidy, N.; Nabavi, S.M. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *84*, 892–908. [CrossRef] [PubMed]
32. Costa, S.L.; Silva, V.D.A.; Souza, C.S.; Santos, C.C.; Paris, I.; Muñoz, P.; Segura-Aguilar, J. Impact of plant-derived flavonoids on neurodegenerative diseases. *Neurotox. Res.* **2016**, *30*, 41–52. [CrossRef] [PubMed]
33. Li, Y.; Yao, J.; Han, C.; Yang, J.; Chaudhry, M.T.; Wang, S.; Liu, H.; Yin, Y. Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients* **2016**, *8*, 167. [CrossRef] [PubMed]
34. Hosseinzade, A.; Sadeghi, O.; Biregani, A.N.; Soukhtehzari, S.; Brandt, G.S.; Esmailzadeh, A. Immunomodulatory effects of flavonoids: Possible induction of T CD4+ regulatory cells through suppression of mTOR pathway signaling activity. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 51. [CrossRef] [PubMed]
35. Chen, Y.C.; Shen, S.C.; Lee, W.R.; Hou, W.C.; Yang, L.L.; Lee, T.J. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell Biochem.* **2001**, *82*, 537–548. [CrossRef] [PubMed]
36. Sakao, K.; Fujii, M.; Hou, D.X. Clarification of the role of quercetin hydroxyl groups in superoxide generation and cell apoptosis by chemical modification. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 2048–2053. [CrossRef]
37. Silva, A.B.; Coelho, P.L.C.; Amparo, J.A.O.; Carneiro, M.M.A.A.; Borges, J.M.P.; Souza, C.S.; Costa, M.F.D.; Mecha, M.; Rodriguez, C.G.; Silva, V.D.A.; et al. The flavonoid rutin modulates microglial/macrophage activation to a CD150/CD206 M2 phenotype. *Chem.-Biol. Interact.* **2017**, *274*, 89–99. [CrossRef]
38. Kim, M.; Park, Y.; Cho, S.; Burapan, S.; Han, J. Synthesis of alkyl quercetin derivatives. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **2015**, *58*, 343–348. [CrossRef]
39. Bao, D.; Wang, J.; Pang, X.; Liu, H. Protective effect of quercetin against oxidative stress-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma (PC-12) Cells. *Molecules* **2017**, *22*, 1122. [CrossRef]
40. Bispo da Silva, A.; Coelho, P.L.C.; Oliveira, M.N.; Oliveira, J.L.; Amparo, J.A.O.; Silva, K.C.; Soares, J.R.P.; Pitanga, B.P.S.; Souza, C.S.; Lopes, G.P.F.; et al. The flavonoid rutin and its aglycone quercetin modulate the microglia inflammatory profile improving antiglioma activity. *Brain Behav. Immun.* **2020**, *85*, 170–185. [CrossRef]
41. Zamin, L.L.; Filippi-Chiela, E.C.; Dillenburg-Pilla, P.; Horn, F.; Salbego, C.; Lenz, G. Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 1655–1662. [CrossRef] [PubMed]
42. Nna, V.U.; Usman, U.Z.; Ofutet, E.O.; Owu, D.U. Quercetin exerts preventive, ameliorative and prophylactic effects on cadmium chloride-induced oxidative stress in the uterus and ovaries of female Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *102*, 143–155. [CrossRef] [PubMed]
43. Bi, Y.; Shen, C.; Li, C.; Liu, Y.; Gao, D.; Shi, C.; Peng, F.; Liu, Z.; Zhao, B.; Zheng, Z.; et al. Inhibition of autophagy induced by quercetin at a late stage enhances cytotoxic effects on glioma cells. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 3549–3560. [CrossRef] [PubMed]
44. Dell’Albani, P.; Di Marco, B.; Grasso, S.; Rocco, C.; Foti, M.C. Quercetin derivatives as potent inducers of selective cytotoxicity in glioma cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *101*, 56–65. [CrossRef] [PubMed]
45. Chen, T.J.; Jeng, J.Y.; Lin, C.W.; Wu, C.Y.; Chen, Y.C. Quercetin inhibition of ROS-dependent and -independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology* **2006**, *223*, 113–126. [CrossRef] [PubMed]
46. Coelho, P.L.C.; Freitas, S.R.V.B.; Pitanga, B.P.S.; Silva, V.D.A.; Oliveira, M.N.; Grangeiro, M.S.; Souza, C.S.; El-Bachá, R.S.; Costa, M.F.D.; Barbosa, P.R.; et al. Flavonoids from the Brazilian plant croton betulaster inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. *Braz. J. Pharmacog.* **2016**, *26*, 34–43. [CrossRef]
47. Costa, S.L. Antiglioma potential of flavonoids. *J. Bioanal. Biomed.* **2014**, *6*, 1–3.
48. Dorman, H.J.D.; Hiltunen, R. Fe(III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. *Food Chem.* **2004**, *88*, 193–199. [CrossRef]
49. Guedes, C.E.S.; Dias, B.R.S.; Petersen, A.L.D.O.A.; Cruz, K.P.; Almeida, N.J.; Andrade, D.R.; Menezes, J.P.B.; Borges, V.M.; Veras, P.S.T. In vitro evaluation of the anti-leishmanial activity and toxicity of PK11195. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2018**, *113*, e170345. [CrossRef]
50. Benda, P.; Lightbody, J.; Sato, G.; Levine, L.; Sweet, W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* **1968**, *161*, 370–371. [CrossRef]
51. Oliveira, D.M.; Lima, R.M.F.; Clarencio, J.; Velozo, E.S.; de Amorim, I.A.; Da Mota, T.H.A.; Costa, S.L.; Silva, F.P.; El-Bachá, R.S. The classical photoactivated drug 8-methoxypsoralen and related compounds are effective without UV light irradiation against glioma cells. *Neurochem. Int.* **2016**, *99*, 33–41. [CrossRef]

-
52. Ahmed, S.A.; Gogal, R.M.; Walsh, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [³H] thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods* **1994**, *170*, 211–224. [[CrossRef](#)]
 53. Hansen, M.B.; Nielsen, S.E.; Berg, K. Re-examination, and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **1989**, *119*, 203–210. [[CrossRef](#)]
 54. Hora, N.R.S.; Santana, L.F.; Silva, V.D.A.; Costa, S.L.; Zambotti-Villela, L.; Colepicolo, P.; Ferraz, C.G.; Ribeiro, P.R. Identification of bioactive metabolites from corn silk extracts by a combination of metabolite profiling, univariate statistical analysis and chemometrics. *Food Chem.* **2021**, *365*, 130479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 55. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 131–138. [[CrossRef](#)]