

NOTAS CIENTÍFICAS

AÇÃO ANTIOXIDANTE DE FLAVONÓIDES MODIFICADOS¹

TÂNIA TOLEDO DE OLIVEIRA², TANUS JORGE NAGEM³,
MARILDA CONCEIÇÃO DA SILVA⁴, LUIZ CARLOS GUEDES DE MIRANDA⁵
e MARCO ANTÔNIO TEIXEIRA⁶

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito antioxidante de derivados flavonoídicos da quercetina, naringenina, morina, e rutina, isolados da cultivar de soja UFV-5. Após acetilação com anidrido acético e piridina, e metilação com diazometano, esses compostos foram analisados para determinação de ação antioxidante por meio dos índices de acidez, iodo e peróxido e pela reação-de-Kreiss. Os melhores resultados foram obtidos com a naringenina metilada, naringenina acetilada, quercetina metilada e quercetina acetilada.

ANTIOXIDANT ACTION OF THE FLAVONOIDS DERIVATIVES

ABSTRACT - The objective of this work was to verify the antioxidant effect of the flavonoid compounds quercetin, naringenin, morin, and rutin isolated from soybean, cultivar UFV-5. After acetylation with acetic anhydride and pyridine, and methylation with diazomethane, indexes of acidity, iodine, and peroxide and Kreiss reaction were determined. The best results were obtained with methylated naringenin, acetylated naringenin, methylated quercetin, and acetylated quercetin.

Os flavonóides constituem um grupo de substâncias naturais que possuem atividades biológicas bastante diversificadas. Estudando sua ação como antioxidante, pesquisas envolvendo não só os compostos flavonoídicos, como também os seus precursores biossintéticos foram bastante desenvolvidas (Richardson et al., 1974; Pratt & Birac, 1979; Rios et al., 1992).

Por outro lado o oxigênio atmosférico é o principal agente responsável pela deterioração de materiais orgânicos e alimentos expostos ao ar. Diversas classes de moléculas são susceptíveis ao ataque de O₂, incluindo proteínas, aminoácidos, lipídios, além de ácidos graxos poliinsaturados, que também reagem com O₂, formando hidroperóxidos. Tais hidroperóxidos contribuem para a deterioração e disfunção em células e membranas celulares (Larson, 1988).

¹ Aceito para publicação em 11 de agosto de 1998.

² Química, D.Sc., Profª Adjunta, Dep. de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP 36570-000 Viçosa, MG.

³ Bioquímico, Ph.D., Prof. Adjunto, Dep. de Química, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), CEP 35400-000 Ouro Preto, MG.

⁴ Bioquímica, Dep. de Química, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Campus da Pampulha, Cidade Universitária, CEP 31270-000, Belo Horizonte, MG.

⁵ Bioquímico, M.Sc., Prof. Adjunto, Dep. de Bioquímica e Biologia Molecular, UFV.

⁶ Químico, D.Sc., Prof. Adjunto, Dep. de Química, UFMG.

O oxigênio, indispensável à vida de organismos aeróbicos, é essencial como aceptor de elétrons. O O₂, envolvido no processo respiratório, em certas condições, no organismo, pode ser transformado em ânion superóxido, radical hidroxila, oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio, e todas essas variações estão envolvidas na toxicidade de O₂. A geração de vários tipos tóxicos de O₂ ocorrem em circunstâncias patológicas, incluindo reações inflamatórias. Os processos de lipoperoxidação podem ocorrer atacando as membranas celulares. Os flavonóides quercetina, kaempferol têm-se mostrado ativos como agentes antiinflamatórios atuando na inibição da biossíntese de eicosanóides envolvidos em processos inflamatórios via atividade anti-radicalar e antiperoxidante (Larson, 1988).

Hoje existe uma grande discussão em relação à doença de Alzheimer, causada pela presença de radicais livres, através do acúmulo de B amilóide. A liberação dessa proteína conduz, por fragmentação, à formação de radicais livres, que modificam as membranas dos neurônios (Hensley, 1994).

A ação dos ácidos fenólicos como ácido caféico, ácido clorogênico e seus isômeros, incluindo ácido 4-O-cafeioil-quínico e ácido ferúlico, mostrou sua potencialidade em diminuir efeitos indesejáveis (Pincemail et al., 1987).

Pratt & Birac (1979) estudaram os efeitos da quercetina, quercitrina, myricetina, myricetina-3-monoglucosídeo, quercetina 3-monoglucosídeo, quercetina 3-triglucosídeo extraídos de sementes de diversas plantas como antioxidantes por meio da determinação da atividade antioxidante, utilizando etanol absoluto e fazendo determinações espectrométricas a 258 nm, enquanto Rios et al. (1992) testaram os efeitos de cinco flavonóides glicosilados de *Sideritis javalambrensis* como inibidores da peroxidação de lipídeos nos microsomas.

Richardson et al. (1974) testaram o efeito de flavonas e derivados de flavonas como antioxidantes em amostras de leite e comprovaram a eficácia de suas ações.

Antioxidantes naturais, principalmente os compostos fenólicos, também foram encontrados em vários vegetais, conforme trabalhos realizados por Harel & Kanner (1984), Farr et al. (1988), Sheabar & Neeman (1988), Zhao et al. (1989), Namiki (1990), Pratt & Hudson (1990), Loliger (1991) e Kanner et al. (1994).

Pela importância que tais compostos assumem na indústria farmacêutica e de alimentos, este estudo teve como objetivo verificar o efeito antioxidante de derivados flavonoídicos da morina, naringenina, rutina, e quercetina extraídos de sementes de soja cv. UFV-5.

Alguns compostos flavonoídicos - morina, naringenina, rutina e quercetina - extraídos do óleo de sementes de soja cv. UFV-5 segundo o método de Murphy & Stutte (1970) e Naim et al. (1973), foram acetilados e metilados.

A acetilação constou da adição de anidrido acético e piridina. A mistura reacional foi aquecida à ebulição por 24 horas, seguida da adição de gotas de HCl e vertida em banho de gelo picado. O precipitado branco obtido foi separado por filtração, lavado com água, e em seguida cromatografado em coluna de sílica, levando ao isolamento final de um material sólido branco, que foi purificado por recristalização, em metanol, originando os produtos cristalinos.

A metilação parcial dos compostos flavonoídicos foi feita em solução etérea de diazometano recentemente preparada por reação envolvendo a adição lenta de nitrosometiluréia a uma solução aquosa de KOH (50%) em éter sulfúrico colocado em banho de gelo. Após separação da camada etérea, esta

foi deixada em contato, em temperatura ambiente, com os flavonóides, isoladamente, por uma noite. Após evaporação do solvente, o produto foi purificado por recristalização em etanol.

Para verificação da ação antioxidante dos compostos flavonoídicos, foram determinados os índices de acidez, iodo e peróxido, e reação-de-Kreiss. As amostras analisadas consistiram de óleo de soja puro extraído da cv. UFV-5 (sem antioxidante), óleo de soja refinado (com antioxidante), e frações de óleo de soja puro, às quais foram adicionados 20 mg/mL de naringenina, rutina, morina e quercetina, metiladas e acetiladas. As amostras ficaram armazenadas por 12 dias, a 45°C para o teste de acidez e a 37°C para os demais testes.

Para a determinação do índice de acidez, foram pesadas 2 g de cada amostra e adicionados 25 mL de uma mistura éter-álcool 2:1 v/v com agitação, e duas gotas de fenolftaleína. A titulação foi feita com NaOH 0,1 N até o aparecimento de coloração rósea.

Para a determinação do índice de iodo, foram pesados 0,25 g da amostra em um vidro de relógio, transferindo-a, com 10 mL de clorofórmio, para um frasco erlenmeyer de 500 mL, com rolha esmerilada. A seguir, adicionou-se através de uma bureta 20 mL de solução de iodo, deixando-se em repouso durante 30 minutos, ao abrigo de luz, com agitação ocasional. Após esse tempo, adicionaram-se 10 mL de solução recente de iodeto de potássio a 15%, e 100 mL de água, e titulou-se o excesso de iodo com solução de tiosulfato de sódio até o desaparecimento da cor azul. Uma prova em branco foi realizada nas mesmas condições descritas anteriormente, sem a presença da amostra. A diferença de volume de solução de tiosulfato de sódio das duas titulações é equivalente à quantidade de iodo absorvido pela amostra (Pregnotatto & Pregnotatto, 1985).

Para a determinação do índice de peróxido, 5 g de amostra foram dissolvidas em 30 mL de solução de ácido acético-clorofórmio 3:2 v/v. A seguir, foi adicionada uma solução saturada de iodeto de potássio e a mistura deixada em repouso por exatamente um minuto, e então, foram adicionados 30 mL de água. Titulou-se, com solução de tiosulfato de sódio 0,01 N, com agitação, até que a coloração rósea desaparecesse. A seguir, adicionaram-se 0,5 mL de solução de amido a 1%, e prosseguiu-se a titulação até o ponto final, quando todo o iodo se liberou da camada de clorofórmio. A seguir, adicionou-se, gota a gota, a solução de tiosulfato de sódio 0,01 N, até o desaparecimento da coloração azul. Foi feita uma prova em branco, nas mesmas condições, (Pregnotatto & Pregnotatto, 1985).

A reação com floroglucina (reação-de-Kreiss) foi realizada colocando-se 5 mL de amostra em uma proveta de 50 mL, com rolha esmerilada. Adicionaram-se 5 mL de ácido clorídrico, e agitou-se por 30 segundos. A seguir, foi adicionada uma solução de floroglucina a 0,1%, em éter, agitando-se por 30 segundos, e deixando em repouso por 10 minutos. Na presença de substâncias rançosas, provenientes da oxidação de lipídios, a camada inferior apresentou uma coloração rósea ou vermelha (Pregnotatto & Pregnotatto, 1985).

A identificação dos produtos acetilados e metilados foi feita mediante os métodos espectrométricos de análise orgânica (UV, IV, RMN¹H), ponto de fusão, e comparação com dados disponíveis na literatura.

A Tabela 1 mostra que o óleo de soja misturado aos flavonóides apresenta índices de acidez, iodo, e peróxido iguais ou menores que os valores normais tabelados-CNNPA (Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação, 1978), de 0,42 em porcentagem de ácido oléico, de 188-198 mg/100 g, e de 20 meq/kg, respectivamente.

TABELA 1. Ação antioxidante de compostos flavonóidicos metilados (M) e acetilados (A), adicionados ao óleo de soja, cv. UFV-5¹.

| Amostra de óleo de soja | Índice de acidez (% em ácido oléico) | Índice de iodo (mg/100 g) | Índice de peróxido (meq/kg) | Reação-de- Kreiss |
|------------------------------|--|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| UFV-5 + Morina A | 0,42c | 186,66a | 20,00b | Incolor |
| UFV-5 + Morina M | 0,40cd | 184,66a | 19,00c | Incolor |
| UFV-5 + Naringenina M | 0,37e | 185,00a | 19,00c | Incolor |
| UFV-5 + Naringenina A | 0,40d | 186,00a | 18,00d | Incolor |
| UFV-5 + Quercetina M | 0,37e | 186,00a | 17,66d | Incolor |
| UFV-5 + Quercetina A | 0,37e | 185,00a | 18,00d | Incolor |
| UFV-5 + Rutina M | 0,37e | 187,00a | 17,66d | Incolor |
| UFV-5 (sem antioxidante) | 3,54a | 54,00b | 36,00a | Vermelho |
| Comercial (com antioxidante) | 0,53b | 185,66a | 20,00b | Incolor |

¹Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos do óleo de soja comercial e também aos observados por outros estudos utilizando flavonóides como antioxidantes extraídos de diversas plantas (Pincemail et al., 1987; Larson, 1988). Os resultados mostram, ainda, que pela reação-de-Kreiss todos os compostos apresentaram atividade antioxidante, pois apenas a amostra de óleo de soja sem antioxidante apresentou coloração vermelha, o que indica a presença de peróxido no meio.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO. **Compêndio de resoluções do CNNPA**. São Paulo, 1978. p.6-145.
- FARR, D.R.; MAGNOLATTO, D.; LOLINGER, J. Protection of food-stuffs from oxidation. **U.S. Pat. 4741915**, 1988.
- HAREL, S.; KANNER, J. Lipid antioxidizing factors in orange peel. **International Fruit Juice Union Proceedings**, v.18, p.185, 1984.
- HENSLEY, K. La Recherche: Alzheimer et radicaux libres. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.25, n.266, p.620, juin. 1994.
- KANNER, J.; FRANKEL, E.; GRANIT, R.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E. Natural antioxidants in grapes and wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.64-69, 1994.
- LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v.27, n.4, p.969-978, 1988.
- LOLIGER, J. The use of antioxidants of foods. In: AUROMA, O.I.; HALLIWELL, B. (Eds.). **Free radicals and food additives**. London: Taylor & Francis, 1991. 121p.
- MURPHY, J.B.; STUTTE, C.A. Analysis for substituted benzoic and cinamic acids using high pressure liquid chromatograph analysis. **Journal of the Biochemistry**, v.86, p.220-228, 1970.

- NAIM, M.; GESTETNER, B.; KIRSON, I.; BIRK, Y.; BONDI, A. A new isoflavone from soya beans. **Phytochemistry**, v.12, p.169-170, 1973.
- NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in foods. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.29, p.273-291, 1990.
- PINCEMAIL, J.; THIRION, A.; DUPUIS, M.; BRAQUET, P.; DRIEU, K.; DEBY, C. Ginkgo biloba extract inhibits oxygen species production generated by phorbol myristate acetate stimulated human leukocytes. **Experientia**, v.43, p.181-184, 1987.
- PRATT D.E.; BIRAC, P.M. Source of antioxidant activity in soybeans. **Journal of Food Science**, v.44, p.1720-1722, 1979.
- PRATT, D.E.; HUDSON, B.J.F. In: HUDSON, B.J.F. (Ed.). **Food antioxidants**. London: Elsevier, 1990. p.171.
- PREGNOLATTO, W.; PREGNOLATTO, N.P. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 1985. 262p.
- RICHARDSON, G.A.; EL-RAFEY, M.S.; LONG, M.L. Flavones and flavone derivatives as antioxidants. **Journal of Dairy Science**, v.30, p.143-397, 1974.
- RIOS, J.L.; MAÑEZ, S.; PAYA, M.; ALCARAZ, M.J. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. **Phytochemistry**, v.31, n. 6, p.1947-1950, 1992.
- SHEABAR, F.Z.; NEEMAN, I. Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives. **Journal of the American Oil Chemical Society**, v.65, p.990-991, 1988.
- ZHAO, B.; LI, X.; HE, R.G.; CHENG, S.J.; WENJURAN, X. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. **Cell Biochemistry**, v.14, p.175-177, 1989.