UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina:
determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação
de suas atividades antioxidantes

Carla Aparecida Pedriali

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz

São Paulo
2005

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P371s Pedriali, Carla Aparecida
Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina :
determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação
de suas atividades antioxidantes. / Carla Aparecida Pedriali. --
São Paulo, 2005.
127p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Polakiewicz, Bronislaw

1. Fármaco : Síntese : Química farmacêutica 2. Fármaco :
Análise química I. T. II. Polakiewicz, Bronislaw, orientador.

615.19 CDD

Carla Aparecida Pedriali

Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz
orientador/presidente

Profa. Dra. Cristina Northfleet de Albuquerque
FCF/USP
1^a. examinadora

Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares
IQ/USP
2^a. examinadora

São Paulo, 27 de junho de 2005.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Carla Aparecida Pedriali no Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 27 dias do mês de junho de 2005, realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Carla Aparecida Pedriali, apresentada para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Área: Tecnologia Químico-Farmacêutica, intitulada:

"Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Bronislaw Polakiewicz	Presidente	FCF	aprovado
Cristina Northfleet de Albuquerque	Titular	FCF	aprovado
Marina Franco Maggi Tavares	Titular	IQ	aprovado
Resultado Final: APROVADO			
Parecer da Comissão Julgadora			

Eu, Mirian Bernardes Lopes Alves, Técnico para Assuntos Administrativos, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 27 dias do mês de junho de 2005.

Cristina Northfleet de Albuquerque

Marina Franco Maggi Tavares

Bronislaw Polakiewicz
Orientador(a)

Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

OCCEA nº 38/2004

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto “Síntese de uma biblioteca de derivados hidrossolúveis da rutina e determinação de suas propriedades físico-químicas e antioxidantes” (Protocolo nº 42), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). **Carla Aparecida Pedriali** e do orientador(a) Bronislaw Polakiewicz, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 04/10/2004.*

São Paulo, 05 de outubro de 2004.

Prof^a. Associada Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA

DEDICATÓRIA

A Deus e pela intercessão de São Judas Tadeu que me deu sabedoria e colocou as pessoas certas em minha vida e que me ajudaram.

A Antonio Pedriali Sobrinho, Fátima Larangeira Pedriali, Marcelle Cristina Pedriali e Tatiane Pedriali, meus pais e irmãs, com amor, carinho, gratidão pela toda sua compreensão, dedicação, paciência e por todos os exemplos de vida deixados a cada momento.

A Dante, uma pessoa muito especial em minha vida, com todo amor, carinho e admiração, agradeço-lhe por todo carinho e atenção dedicados.

Em especial aos meus amigos por todo apoio, atenção, carinho e incentivo dispensados por Karla Teixeira Farias de Novaes, Mauro Sérgio Cândido de Souza, Camila Borgognoni, Maria das Graças B. dos Santos, Sônia Regina da Silva, Cândida da Costa Maciel, Marilene, Dona Irene e Ivani Aparecida Raphael.

A Adilfa, Fabiane, Elizane, Silvia Kacman, Kátia, Kelly Cristina e Fátima Fasaleh, velhas amigas por todo incentivo e apoio concedido.

A Rachel Abisag Pacheco Chavéz *in memoriam*, pelo seu grande exemplo de perseverança e paciência.

Ao Prof. Dr. Antonio Álvaro Alencar de Queiroz e a Profa. Dra. Cláudia Mauro, pelo incentivo e por todo o apoio concedido durante os passos iniciais de minha carreira acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz, por ter me recebido como orientanda do Curso de Mestrado e por toda a paciência, ensinamentos e apoio disponibilizado durante estes anos de convivência.

Ao Prof. Dr. José Abrahão Neto e Profa. Dra. Cristina Northfleet de Albuquerque, por toda a atenção, ensinamentos e apoio durante todo o processo de Mestrado, os quais muito contribuíram para o meu crescimento científico e intelectual.

Ao Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista e Erick Leite Bastos pelos comentários pertinentes.

Aos professores: Orlando Zancanaro Júnior, Adalberto Pessoa Júnior, João Carlos Monteiro de Carvalho, Sunao Sato, Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo, Suzana Caetano da Silva Lannes, Susana Marta Isay Saad e Terezinha de Jesus Andreoli Pinto pela atenção e apoio.

Ao Prof. Luiz Antonio Gioelli, aos pós-graduandos Chiu Chih Ming e Denise D'Agostini e a Claudia Cristiane Norie Kuroiva pela colaboração no trabalho resumido apresentado na IX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP 2004, intitulado **Preparação de formulações de derivados de gordura de frango e estearina de palma com succinil quitosana e carboximetilcelulose.**

A Prof. Dra. Maria Valeria Robles Velasco, pelo apoio e incentivo no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) pela disciplina de graduação em Cosmetologia, realizado no 2º semestre de 2004.

A Profa. Dra Silvia Berlanga de Moraes Barros e a seus alunos do laboratório de Patologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (FCF-USP), por colocar a disposição a área experimental do seu laboratório para as análises de antioxidantes pelo sistema do ácido tiobarbitúrico.

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani e aos seus alunos do laboratório de Quimiluminescência Aplicada e Biomateriais do Departamento de Química Orgânica (IQUSP), pela disponibilização do uso do luminômetro.

Ao Prof. Dr. Antonio Salatino e a Mourisa Maria de Souza Ferreira do laboratório de Fitoquímica e Sistemática Molecular do Departamento de Botânica (IBUSP), pela disponibilização de seu laboratório para a purificação dos derivados da rutina por papel cromatográfico.

A Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares e aos seus alunos do laboratório de Cromatografia de Eletroforese Capilar (LACE) do Departamento de Química Analítica (IQUSP), pela disponibilização de seu laboratório para a análise das amostras por eletroforese capilar.

A Prof. Dra. Inar Alves de Castro e aos seus alunos do laboratório de Bioquímica de Alimentos Naturais do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (FCF-USP), pelo apoio dos dados estatísticos e também pela orientação em relação aos testes de antioxidantes.

A Profa. Maria Inês pela colaboração na interpretação dos resultados do espectro de infravermelho e de RMN.

Aos meus amigos e funcionários do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, que diretamente ou indiretamente me ajudaram e incentivaram Leandra de Cássia Bernusso, André Luis da Silva Novaes, Laura Affonso, Renata Pasqualini Borges, Karine Gargioni (pelo apoio inicial), Marcos Camargo Knirsch, Rose, Miriam Morais Paiva Santos, Elza Ferreira Silva, Jorge Alves de Lima, Elaine Midori Ychico, Maria de Fátima S.G. Morashashi, Rose (Bloco 17).

Ao Nestor da Farmaservice, pela disponibilização de alguns materiais de laboratório e matérias-primas.

Ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À Comissão de Apoio a Pesquisa do Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

" O rio atinge os seus objetivos porque aprendeu a contornar os obstáculos."
André Luis

**"Os grandes navegadores devem sua ótima reputação às grandes tempestades."
Epicuro – filósofo grego**

Sucesso é rir muito e com frequência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza e encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social. Saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu. Isto é ter tido sucesso!"
Ralph Waldo Emerson

*"Nada no mundo pode substituir a persistência.
O talento não pode. Nada é mais comum do que homens talentosos frustrados.
O gênio não pode: o gênio não recompensado é quase proverbial.
A educação não pode: o mundo está cheio de fracassados instruídos.
Apenas a persistência e a determinação são onipotentes."*

EMOÇÕES

Quando eu estou aqui
Eu vivo este momento lindo
Olhando para você
E as mesmas emoções sentindo

São tantas já vividas
São momentos que eu não me esqueci
Detalhes de uma vida
Histórias que eu contei aqui

Amigos eu ganhei
Saudades eu senti partindo
E às vezes eu deixei
Você me ver chorar sorrindo

Sei tudo que o amor
É capaz de me dar
Eu sei já sofri
Mas não deixo de amar

Se chorei ou se sorri
O importante é que
Emoções eu vivi

São tantas já vividas
São momentos que eu não me esqueci
Detalhes de uma vida
Histórias que eu contei aqui

Eu estou aqui
Vivendo este momento lindo
De frente pra você
E as emoções se repetindo

Em paz com a vida
E o que ela me traz
Na fé que me faz
Otimista demais

Se chorei ou se sorri
O importante é que
Emoções eu vivi

RESUMO

PEDRIALI, C.A. **Síntese de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes.** 2005. 127f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

A rutina é um flavonol glicosídico pertencente a uma importante classe de flavonóides, sendo extensamente encontrados na natureza. Ela apresenta uma importância terapêutica em virtude de determinar a normalização da resistência e permeabilidade das paredes dos vasos capilares, além de inibir o processo de formação de radicais livres em vários estágios. O fruto do faveiro (*Dimorphandra mollis* Benth., uma espécie nativa brasileira) é uma das fontes para a extração em escala industrial da rutina. A sua aplicação em formas farmacêuticas para o uso externo é muito limitada devido a sua baixa solubilidade em água. Com esta finalidade, foi realizada a síntese química através da introdução de grupos carboxilatos nas hidroxilas dos grupamentos glicosídicos da molécula de rutina, utilizando-se piridina e diferentes anidridos, sendo eles: o succínico, o ftálico e o 2-fenil-glutárico à temperatura de 70 °C por 24 horas. Estes três derivados sintetizados foram purificados em papel cromatográfico e caracterizados em 2 sistemas de proporções diferentes de eluentes. Além disso, foi feito um estudo comparativo entre as suas propriedades físico-químicas e as da rutina pela determinação da solubilidade e do coeficiente de extinção molar. Desta forma, avaliou-se a atividade antioxidante destes derivados com relação a rutina utilizando 2 ensaios diferentes, como a determinação de malondialdeído pela autoxidação do tecido cerebral e produção de radicais peroxilas pela termólise de um azo-iniciador, com os seus respectivos padrões de referência, o α -tocoferol e o Trolox. O resultado do ensaio de solubilidade indicou que a rutina succinil, a ftaloil e a fenil-glutaroil foram cerca de 800, 85 e 5,5 vezes mais solúvel em água que a rutina. Já em relação aos outros ensaios verificou-se que os derivados sintetizados continuaram apresentando atividade antioxidante e absorvendo luz em seu pico máximo próximo de 392nm, o que mostrou pouca modificação química no núcleo flavonóide. No ensaio de anti-radicaís, a rutina ftaloil foi entre os derivados hidrossolúveis a que apresentou um melhor resultado devido a sinergia do anel aromático com o núcleo flavonóide em seqüestrar radicais livres.

Palavras-chave: Rutina. Derivados hidrossolúveis da rutina. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

PEDRIALI, C.A. **The chemical synthesis of water-soluble derivatives of rutin: determination of its physico-chemical properties and evaluation of its antioxidants activities.** 2005. 127f. Dissertation of Master – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2005.

Rutin is a glycoside flavonol which belongs to an important class of flavonoids, being extensively found in the nature. It presents a therapeutical importance due to improve the resistance and permeability of capillaries vessels, and is able to suppress free radical processes in some stages. The fruit of the *faveiro* (*Dimorphandra mollis* Benth., a Brazilian native species) is one of the sources for the extration in industrial scale of the rutin. Its application in pharmaceutical forms for external use very is limited because it has low solubility in water. With this purpose, it was done the chemical synthesis introducing carboxylate groups on sugar moiety of rutin using pyridin and different anhydrides, such as: succinic, phtalic and the 2-phenyl glutaric at 70 °C for 24 hours.

These three synthesized derivatives had been purified in chromatographic paper and characterized in 2 systems of different ratios of eluents. Moreover, a comparative study among their physico-chemical properties and of the rutin for the determination of the solubility and the molar extinction coefficient. With this in mind, it was evaluated antioxidant activity of these derivatives with regard to rutin using 2 different assays, as the determination of malondialdehyde by the brain homogenate autoxidation and generation of peroxy radicals by the thermolysis of a azo compound, with its respective reference standards: α -tocopherol and Trolox. The result of the solubility assay indicated that the succinyl, the phtaloyl and the phenyl glutaroyl rutin had been about 800, 85 and 5,5 times, respective, more soluble in water that the rutin. In respect to relationship to the other assays it was verified that the synthesized derivatives had continued presenting antioxidant activity and absorbing light in its maximum peak next to 392nm, showing that chemical modifications in the flavonoid nucleus had not been made significant. In the assay of anti-radicals, the phtaloyl rutin was the water-soluble derivative what it presented one better result, due one the presence of the aromatic ring that can enhanced the radical-scavenging efficiencies together to the flavonoid nucleus.

Keywords: Rutin. Water-soluble derivatives of rutin. Antioxidant activity.

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

- AAPH – dihidrocloridrato de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano
- ABTS^{•+} – cátion 2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato)
- ABTS – ácido 2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfônico
- ABAP – hidrocloreidrato de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano
- AMVN – 2,2'-azo-bis-2,4-dimetilvaleronitrila
- Br₂[•] – molécula radical de bromo
- CCl₃COO[•] – ácido radical tricloroacético
- cobre (II)-H₂O₂ – (*Oxygen-Radical Absorbance Capacity*) ensaio onde os radicais gerados são os hidroxilas
- cobre (I) (ORAC_{Cu}), – (*Oxygen-Radical Absorbance Capacity*) ensaio onde os radicais gerados são por um oxidante de metal de transição
- DMF – N,N-dimetil formamida
- DMAP – N,N-dimetilpiridin-4-amina
- DMPD – N,N-dimetil-p-fenilenediamina
- DMPD^{•+} – cátion radical de N,N-dimetil-p-fenilenediamina
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- DPPH[•] – radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- e⁻ – elétron
- EAO – espécies ativas do oxigênio
- Fe²⁺ – (ferroso) estado de transição 2⁺
- Fe³⁺ – (ferrico) estado de transição 3⁺
- GSH – glutatona reduzida
- GSH-Px – glutatona-peroxidase selênio-proteína
- GSH-Rd – glutatona-redutase
- GSSG – glutatona oxidada
- HO₂[•] – hidroperoxila
- H₂O – água
- H⁺ – próton
- H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
- HOCl – ácido hipocloroso

IC₅₀ – concentração inibitória (concentração em µg/mL necessária para inibir 50% da formação de autoxidação do homogenato de cérebro de rato)

i.v. – intra-venoso

IV- infravermelho

L[•] – radical alquila

LOO[•] – radical peroxila

LOOH – hidroperóxido lipídico

LD₅₀ – dose letal (dosagem letal em 50% das cobaias em estudo)

Luminol – 5-amino-2,3-dihidro-ftatazina-1,4-diona

MDA – malondialdeído

N₃[•] – radical azida

NO[•] – óxido nítrico

NADP – nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato

NADPH – nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida

⁻ OCl – hipoclorito

O₂ – oxigênio molecular

OH[•] – radical hidroxila

O₂^{•-} – ânion radical superóxido

O₃ – ozônio

¹O₂ – oxigênio singlete

ORAC – capacidade de atividade antioxidante medida pela absorbância do radical de oxigênio (*Oxygen-Radical Absorbance Capacity*).

ORAC_{ROO[•]} – (*Oxygen-Radical Absorbance Capacity*) ensaio onde os radicais gerados são os peroxilas

PUFA – ácidos graxos poli-insaturados

ROO[•] – radical peroxila

RLU – unidades relativas de emissão de luz

RMN ¹H – ressonância magnética nuclear de próton

ROS – espécies reativas de oxigênio

SOD-cobre-zinco – enzimas superóxido dismutase (utiliza o cobre e zinco)

SOD – enzimas superóxido dismutase

SOD-manganês – enzimas superóxido dismutase (utiliza o manganês)

TBA – ácido 2-tiobarbitúrico

TCA – ácido tricloroacético

TCL – camada de cromatografia delgada (*Thin Chromatography Layer*)

TEAC – capacidade antioxidante de equivalente de Trolox (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)

TEP – 1,1,3,3-tetraetoxipropano

α -tocoferol – ácido 6-hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-óico

TRAP – parâmetro antioxidante de radical total (*Total Radical Antioxidant Parameter*)

TRIS – hidroximetil-aminometano

Trolox – derivado hidrossolúvel do α -tocoferol

UDP-D glicose – uridina difosfato – D-glicose

UV/Vis – ultravioleta/visível

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química da rutina.....	22
Figura 2	Redução tetravalente do oxigênio molecular (O ₂) na mitocôndria até a formação de água (H ₂ O). Várias espécies reativas de O ₂ são formadas no processo. (Adaptado de Cohen, 1989).....	27
Figura 3	Inter-relação entre os radicais livres e antioxidantes.....	30
Figura 4	Estrutura química do α -tocoferol.....	31
Figura 5	Origem dos flavonóides e a representação do esqueleto de carbono C ₆ -C ₃ -C ₆	33
Figura 6	As estruturas químicas das sub-classes dos flavonóides.....	34
Figura 7	Reação dos flavonóides como antioxidantes e anti-radicais livres.....	37
Figura 8	Regiões estruturais dos flavonóides com uma alta atividade de seqüestro de radicais livres.....	38
Figura 9	Faveiro (<i>Dimorphandra mollis</i>) – árvore nativa do Brasil e fonte de rutina.....	40
Figura 10	Via shiquimato – via de conversão aromática dos compostos fenólicos...	41
Figura 11	Processo de formação dos flavonóides, um principal grupo que apresenta 15 átomos de carbono na sua estrutura.....	42
Figura 12	Formação da rutina a partir da quercetina – pertencentes a sub-classe dos flavonóis.....	43
Figura 13	Síntese de derivados hidrossolúveis da rutina e quercetina.....	45
Figura 14	Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica.....	48
Figura 15	Estrutura química de malondialdeído mostrando as suas formas em diversas faixas de pH.....	50
Figura 16	Formação de um composto fluorescente vermelho 1:2 (MDA:TBA) pelo mecanismo de adição nucleofílica catalisada por um meio ácido e alta temperatura.....	51
Figura 17	Resumo dos radicais livres gerados nos métodos para a avaliação da atividade de seqüestro de radicais livres, onde foi dada ênfase aos radicais peroxilas (ROO [•]) mostrando os principais compostos azo-iniciadores usados	53
Figura 18	Reação do Trolox (ácido 6-hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-óico) com radicais peroxilas.....	55
Figura 19	Reação do luminol com radicais alquil-peroxilas em meio alcalino para a geração de luz.....	57
Figura 20	Termólise do AAPH (dihidrocloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano) gerando nitrogênio e dois radicais alquilas, os quais reagem com o oxigênio formando radicais peroxilas.....	59
Figura 21	Estrutura química da rutina succinil.....	60
Figura 22	Estrutura química da rutina ftaloil.....	61
Figura 23	Estrutura química da rutina fenil-glutaroil.....	61
Figura 24	Eletroferograma do padrão de rutina.....	64
Figura 25	Eletroferograma da rutina succinil (A) sem purificação (B) 1 ^a purificação (C) 2 ^a purificação (D) 3 ^a purificação.....	65
Figura 26	Eletroferograma da rutina ftaloil (E) sem purificação (F) 1 ^a purificação (G) 2 ^a purificação (H) 3 ^a purificação.....	66
Figura 27	Eletroferograma da rutina fenil-glutaroil (I) sem purificação (J) 1 ^a purificação (K) 2 ^a purificação (L) 3 ^a purificação.....	67

Figura 28	Estrutura química do Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-óico).....	80
Figura 29	Esquema da síntese química da rutina succinil.....	91
Figura 30	Esquema da síntese química da rutina ftaloil.....	92
Figura 31	Esquema da síntese química da rutina fenil-glutaroil.....	93
Figura 32	Soluções de etanol a 80% das seguintes amostras: (I) rutina, (II) rutina succinil, (III) rutina ftaloil e (IV) rutina fenil-glutaroil.....	94
Figura 33	Interpretação das amostras em placas cromatográficas de camada delgada.....	95
Figura 34	Espectro de infravermelho da rutina.....	122
Figura 35	Espectro de infravermelho da rutina succinil.....	122
Figura 36	Espectro de infravermelho da rutina ftaloil.....	123
Figura 37	Espectro de infravermelho da rutina fenil-glutaroil.....	123
Figura 38	Espectro de RMN ^1H (300MHz, $\text{C D}_3\text{OD}$) de rutina.....	124
Figura 39	Espectro de RMN ^1H (300MHz, D_2O) de rutina succinil.....	125
Figura 40	Espectro de RMN ^1H (300MHz, D_2O) de rutina ftaloil.....	126
Figura 41	Espectro de RMN ^1H (300MHz, (D_6) DMSO) de rutina fenil-glutaroil....	127
Gráfico 1	Dependência entre a concentração de rutina e a absorbância. Rutina: $y = 0,03687x + 0,03912$. $r = 0,99549$. * Concentração $\times 10^{-6}$ M.....	71
Gráfico 2	Dependência entre a concentração de rutina succinil e a absorbância. Rutina succinil: $y = 0,01223x + 0,01042$. $r = 0,99988$. * Concentração $\times 10^{-6}$ M.....	71
Gráfico 3	Dependência entre a concentração de rutina ftaloil e a absorbância. Rutina ftaloil: $y = 0,0144x + 0,10964$. $r = 0,97824$. * Concentração $\times 10^{-6}$ M.....	72
Gráfico 4	Dependência entre a concentração de rutina fenil-glutaroil e a absorbância. Rutina fenil-glutaroil: $y = 0,01594x + 0,08391$. $r = 0,98229$. * Concentração $\times 10^{-6}$ M.....	72
Gráfico 5	Atividade antioxidante do α -tocoferol através do método de lipoperoxidação espontânea em homogenato de cérebro <i>in vitro</i> pelo teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).....	75
Gráfico 6	Atividade antioxidante da rutina através do método de lipoperoxidação espontânea em homogenato de cérebro <i>in vitro</i> pelo teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).....	75
Gráfico 7	Atividade antioxidante da rutina succinil através do método de lipoperoxidação espontânea em homogenato de cérebro <i>in vitro</i> pelo teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).....	76
Gráfico 8	Efeito da adição de diversas concentrações de Trolox, 11 minutos após o início da reação, sobre a cinética de emissão. RLU – Unidades Relativas de Emissão de Luz. [luminol]: 100 μM ; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=5).....	82
Gráfico 9	Dependência entre a concentração de Trolox e a área de supressão obtida. Trolox: $y = 4,26914x + 0,20808$, $r = 0,96482$. *Área $\times 10^6$ (RLU). [luminol]: 100 μM ; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=5).....	82

Gráfico 10	Efeito da adição de diversas concentrações de rutina, 11 minutos após o início da reação, sobre a cinética de emissão. RLU – Unidades Relativas de Emissão de Luz. [luminol]: 100μM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=5).....	83
Gráfico 11	Dependência entre a concentração de rutina e a área de supressão obtida. Rutina: $y = 6,93702x + 0,61985$, $r = 0,98771$. *Área x 10^6 (RLU). [luminol]: 100μM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=5).....	83
Gráfico 12	Efeito da adição de diversas concentrações de rutina succinil, 11 minutos após o início da reação, sobre a cinética de emissão. RLU – Unidades Relativas de Emissão de Luz. [luminol]: 100μM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=5).....	84
Gráfico 13	Dependência entre a concentração de rutina succinil e a área de supressão obtida. Rutina Succinil: $y = 4,3177x - 0,40729$, $r = 0,96824$. *Área x 10^6 (RLU). [luminol]: 100μM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=5).....	84
Gráfico 14	Efeito da adição de diversas concentrações de rutina ftaloil, 11 minutos após o início da reação, sobre a cinética de emissão. RLU – Unidades Relativas de Emissão de Luz. [luminol]: 100μM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=10).....	85
Gráfico 15	Dependência entre a concentração de rutina ftaloil e a área de supressão obtida. Rutina Ftaloil: $y = 17,69038x + 0,41291$, $r = 0,98367$. *Área x 10^6 (RLU). [luminol]: 100μM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=10).....	85
Gráfico 16	Efeito da adição de diversas concentrações de rutina fenil-glutaroil, 11 minutos após o início da reação, sobre a cinética de emissão. RLU – Unidades Relativas de Emissão de Luz. [luminol]: 100μM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=7).....	86
Gráfico 17	Dependência entre a concentração de rutina fenil-glutaroil e a área de supressão obtida. Rutina fenil-glutaroil: $y = 1,9352x + 0,98024$, $r = 0,96386$. *Área x 10^6 (RLU). [luminol]: 100μM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=7).....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais sub-classes dos flavonóides.....	35
Tabela 2	Resultados dos valores de R_f da rutina e seus derivados hidrossolúveis (ensaio realizado em placas cromatográficas)	62
Tabela 3	Constantes dielétricas de alguns solventes utilizados no experimento de solubilidade.....	68
Tabela 4	Comparação da solubilidade da rutina em relação aos seus derivados hidrossolúveis.....	69
Tabela 5	Picos de absorção de UV da rutina e de seus derivados.....	70
Tabela 6	Valores de concentração e absorção das amostras* para o cálculo do coeficiente de extinção molar. * Rutina (A), Rutina succinil (B), Rutina ftaloil (C) e Rutina fenil-glutaroil (D).....	73
Tabela 7	Valores do coeficiente de extinção molar da rutina e de seus derivados.....	74
Tabela 8	Valores de concentração e absorção da rutina ftaloil para o cálculo do coeficiente de extinção molar.....	72
Tabela 9	Valores de concentração e absorção da rutina fenil-glutaroil para o cálculo do coeficiente de extinção molar.....	73
Tabela 10	Valores do coeficiente de extinção molar da rutina e de seus derivados.....	74
Tabela 11	Valores da concentração do antioxidante ^{&} e da atividade antioxidante (%), através do método de lipoperoxidação espontânea. ^{&} α -tocoferol (A), Rutina (B) e Rutina Succinil (C).....	76
Tabela 12	Valores de IC_{50} do α -tocoferol, da rutina e da rutina succinil.....	77
Tabela 13	Valores da concentração do antioxidante* e da área suprimida (RLU), através do método de seqüestramento de radicais livres usando o sistema AAPH/luminol. *Trolox (A), Rutina (B), Rutina Succinil (C), Rutina Ftaloil (D), Rutina Fenil-glutaroil (E). n = número de amostras.....	87
Tabela 14	Número de radicais seqüestrados (η) por uma molécula inibidora, obtida pelo método AAPH/luminol.....	88
Tabela 15	Sistema de cromatografia de camada delgada estudado.....	94
Tabela 16	Legenda das amostras da Figura 31.....	94
Tabela 17	Valores da concentração da rutina succinil e da área suprimida (RLU), através do método de seqüestramento de radicais livres usando o sistema AAPH/luminol.....	84
Tabela 18	Valores da concentração da rutina ftaloil e da área suprimida (RLU), através do método de seqüestramento de radicais livres usando o sistema AAPH/luminol.....	85
Tabela 19	Valores da concentração da rutina fenil-glutaroil e da área suprimida (RLU), através do método de seqüestramento de radicais livres usando o sistema AAPH/luminol.....	86
Tabela 20	Número de radicais seqüestrados (η) por uma molécula inibidora, obtida pelo método AAPH/luminol.....	87
Tabela 21	Sistema de cromatografia de camada delgada estudado.....	93
Tabela 22	Legenda das amostras da Figura 32.....	93

SUMÁRIO

	JUSTIFICATIVA.....	22
	OBJETIVOS.....	24
1	INTRODUÇÃO.....	26
1.1	O PAPEL DOS ANTIOXIDANTES E A ORIGEM DOS RADICAIS LIVRES	26
1.2	FLAVONÓIDES: DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E IMPORTÂNCIA.....	32
1.3	ORIGEM BIOSSINTÉTICA, FONTES NATURAIS E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DA RUTINA.....	38
1.4	LIPOPEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	46
1.5	MÉTODOS PARA A AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	48
1.5.1	A peroxidação lipídica e o teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).....	49
1.6	MÉTODOS PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE SEQÜESTRO DE RADICAIS LIVRES EM ALIMENTOS E SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	52
1.6.1	Metodologias empregadas para a geração e seqüestro de radicais livres	53
1.6.2	Avaliação da atividade de seqüestros de radicais peroxila usando azo-iniciadores.....	56
2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
2.1	SÍNTESE QUÍMICA, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS DERIVADOS HIDROSSOLÚVEIS DA RUTINA.....	60
2.1.1	Separação e identificação das amostras pela eletroforese capilar	63
2.2	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS DERIVADOS HIDROSSOLÚVEIS DA RUTINA.....	68
2.2.1	Determinação da solubilidade.....	68
2.2.2	Determinação do coeficiente de extinção molar.....	70
2.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> PELO TESTE DO ÁCIDO 2-TIOBARBITÚRICO (TBA).....	74
2.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE SEQÜESTRO DE RADICAIS LIVRES POR MEDIÇÃO QUIMILUMINESCENTE DO SISTEMA AAPH-LUMINOL.....	80
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	89
3.1	MATERIAIS.....	89
3.1.1	Reagentes.....	89
3.1.2	Equipamentos.....	90
3.2	MÉTODOS.....	91
3.2.1	Síntese química dos derivados hidrossolúveis da rutina.....	91
3.2.1.1	Síntese química da rutina succinil.....	91
3.2.1.2	Síntese química da rutina ftaloil.....	92
3.2.1.3	Síntese química rutina fenil-glutaroil.....	92
3.2.2	Purificação dos derivados sintetizados.....	93
3.2.2.1	Cromatografia de camada delgada e purificação das amostras em papéis cromatográficos.....	93
3.2.2.2	Separação e identificação das amostras pela eletroforese capilar.....	96
3.2.3	Determinação da solubilidade.....	97
3.2.4	Ensaio de varredura espectrofotométrica e determinação do coeficiente extinção molar (ϵ)	97
3.2.5	Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).....	98
3.2.5.1	Tratamento dos animais.....	98

3.2.5.2	Avaliação da lipoperoxidação.....	99
3.2.5.3	Obtenção do homogenato de cérebro de rato.....	99
3.2.5.4	Medida da lipoperoxidação através da produção de malondialdeído.....	100
3.2.5.5	Cálculo da concentração de antioxidante.....	100
3.2.6	Determinação da atividade de seqüestro de radicais livres por medição quimiluminescente do sistema AAPH-luminol.....	101
3.2.7	Determinação estrutural: espectroscopia de ressonância magnética nuclear e na região do infravermelho.....	102
3.2.8	Análise estatística.....	103
4	CONCLUSÃO.....	104
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
	ANEXO A – Características físico-químicas dos reagentes utilizados na parte experimental.....	115
	ANEXO B – Espectros na Região do Infravermelho (IV) e Espectros de RMN ¹H.....	122

JUSTIFICATIVA

Os flavonóides são extensamente encontrados na natureza, em sementes e grãos de várias frutas e vegetais, e também ocorrem em diferentes plantas medicinais. Esta importante classe de substâncias naturais apresentam um largo espectro de atividades bioquímicas e farmacológicas incluindo efeitos antioxidantes, vasodilatadores, anti-inflamatórios, anti-alérgicos, antivirais e estimulantes do sistema imunológico.

A rutina, principal foco deste trabalho e cuja estrutura está representada na Figura 1, pertence à classe dos flavonóides. Apesar desta substância ser relativamente distribuída nas plantas, somente um pequeno número destas fontes contém quantidades suficientes para a extração pelas indústrias. As principais fontes de rutina são *Sophora japonica* L., Fabaceae, uma árvore encontrada no norte e centro da China e *Fagopyrum esculentum* Moench, *F. tataricum* (L.) Gaertn., Polygonaceae, o trigo sarraceno. Aqui no Brasil a principal fonte é a *Dimorphandra mollis*, o fruto do faveiro.

Figura 1. Estrutura química da rutina.

O interesse em utilizar a rutina em formulações cosméticas e farmacêuticas é cada vez maior, devido às suas propriedades antioxidantes, e vasoprotetoras, promovendo uma melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos, diminuindo a fragilidade capilar.

Em função destas características e pela sua baixa solubilidade em água (0,125g/L) limitando o seu uso, neste trabalho desenvolveu-se uma tecnologia de síntese com modificações químicas nos grupamentos glicosídicos da molécula de rutina, visando aumentar a sua solubilidade em água. E sua principal aplicação seria em formas farmacêuticas para uso externo (cremes, géis, pomadas, *sprays*, membranas para liberação controlada de fármacos) mantendo as propriedades farmacológicas, como a atividade antioxidante por exemplo, da rutina de partida.

OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi o de desenvolver uma tecnologia que pudesse ser aplicada para promover um aumento da solubilidade da rutina em água, conservando pelo menos em parte as propriedades farmacológicas originais. Tal trabalho fundamentou-se na pesquisa de um grupo francês, Alluis, Pérol, El hajji e Dangles (2000), que enfocou a reação de síntese de derivados hidrossolúveis de rutina introduzindo grupos carboxilatos e sulfatos às hidroxilas dos grupamentos glicosídicos com várias concentrações de anidrido succínico usando como catalisador o DMAP (N,N-dimetilpiridin-4-amina) e como solvente a piridina, sem promover acilação nas hidroxilas do anel flavonóide neste sistema.

Neste trabalho foi realizada a síntese de conversão de todos os grupos hidroxilas do dissacarídeo da molécula de rutina a grupos ésteres. Isto foi feito através de uma modificação da técnica usada, anteriormente, pelo grupo de pesquisa citado introduzindo grupos carboxilatos provenientes de um excesso de anidrido succínico, ftálico e 2-fenilglutárico, respectivamente, e utilizando uma base fraca como a piridina a 70 °C, sem promover modificações significativas no núcleo flavonóide.

Estes derivados hidrossolúveis sintetizados a partir da rutina, contendo carboxilatos acíclicos, cíclicos e aromáticos foram, primeiramente, purificados em papéis cromatográficos e comprovação da pureza em eletroforese capilar. Após isto, foram realizadas as análises instrumentais para confirmação de suas estruturas químicas através da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear RMN ^1H e espectroscopia no Infravermelho (IV). As características físico-químicas foram analisadas através dos ensaios de determinação da solubilidade, do coeficiente de extinção molar e do espectro de absorção UV de 200 a 400nm.

Além disso, determinou-se a atividade antioxidante destes derivados hidrossolúveis em relação a rutina sem modificações químicas. Para isto utilizou-se dois ensaios diferentes; um

com o malondialdeído avaliando a autoxidação de tecido cerebral, e o outro através da quimiluminescência avaliando a geração de radicais livres por uma termólise de um azoiniciador, usando como referência o α -tocoferol e o Trolox (derivado hidrossolúvel do α -tocoferol).

1 INTRODUÇÃO

1.1 O PAPEL DOS ANTIOXIDANTES E A ORIGEM DOS RADICAIS LIVRES

A evolução de seres procariontes com capacidade fotossintética foi um marco, pois possibilitou o aproveitamento do oxigênio na atmosfera permitindo o aparecimento de outras formas de vida aeróbicas, como protistas, plantas, fungos até animais superiores. O estado fundamental do oxigênio molecular, O_2 , é essencial para torná-lo aceptor de elétrons e indispensável em muitas das vias metabólicas convencionais, onde a sua utilização permite um melhor aproveitamento da transformação de substâncias orgânicas dos alimentos em energia necessária à vida (SOHAL; ALLEN, 1986; HALLIWELL, 1994; ARUOMA, 1994).

No metabolismo normal há formação de intermediários denominados de espécies reativas de oxigênio (ROS). Este termo é freqüentemente utilizado para descrever não somente radicais livres como: radical hidroxila ($OH^\bullet$), ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), óxido nítrico ($NO^\bullet$) e radical peroxila ($ROO^\bullet$), mas também os que não são radicais livres como: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3), oxigênio singlete (1O_2) e ácido hipocloroso ($HOCl$), os quais podem induzir reações radicalares no organismo (HALLIWELL, 1994; ARUOMA, 1994).

Os radicais livres podem ser definidos como espécies capazes de existência independente que contenham um ou mais elétrons desemparelhados (ARUOMA, 1994; HALLIWELL, 1994).

As células produzem estas espécies potencialmente destruidoras: (a) nas mitocôndrias, em consequência da respiração aeróbica normal que consome oxigênio molecular, reduzindo-o por uma sequência de etapas à água, conforme mostrado na Figura 2. (b) Nas células fagocitárias como os linfócitos que reconhecem as células do próprio organismo que se

tornaram tumorais ou foram infectadas por parasitas, fungos, bactérias ou vírus, e as destroem por uma oxidação através de $\text{NO}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet -}$, H_2O_2 , e OCl^- (hipoclorito). (c) Peroxissomas, os quais são organelas responsáveis pela degradação de ácidos graxos e outras moléculas e produzem H_2O_2 . (d) Enzimas do citocromo P-450 em animais que constituem um sistema de defesa primário contra substâncias químicas tóxicas (KEHRER; SMITH, 1994; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ARUOMA, 1994).

Na maioria das reações intracelulares cada molécula de oxigênio recebe quatro elétrons de uma só vez, neutralizando a tendência do oxigênio à redução monoeletrônica (Figura 2), sendo importante a existência de um sistema enzimático, como o citocromo oxidase, sem a formação de intermediários. Ainda assim, o processo de redução de cerca de 5% do oxigênio consumidos passa por etapas monoeletrônicas, com formação das espécies reativas do oxigênio como radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$), hidroperoxila ($\text{HO}_2^\bullet$) e hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SOHAL; ALLEN, 1986; COHEN, 1989; HALLIWELL, 1994).

Figura 2. Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de O_2 são formadas no processo. (Adaptado de Cohen, 1989).

Além dessas espécies serem geradas no processo endógeno fisiológico, também são geradas no patológico, e por fontes exógenas como: algumas substâncias presentes nos alimentos, alguns fármacos, luz ultravioleta, radiação ionizante, poluição, fumo, o álcool, e entre outras (HALLIWELL, 1994; ARUOMA, 1994).

Para neutralizar o efeito oxidante dessas espécies, as células em seu processo evolutivo desenvolveram um sistema de defesa antioxidante como proteção contra a toxicidade do oxigênio molecular. Em 1969, McCord e Fridovich descobriram a enzima superóxido dismutase (SOD) e este fato foi uma grande evolução para a pesquisa dos radicais livres envolvidos nas doenças humanas.

A superóxido-dismutase corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição, como a forma SOD-cobre-zinco presente no citosol e a forma SOD-mangânês localizada na mitocôndria. Ela catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ (HALLIWELL, 1994; BARBER; HARRIS, 1994).

Além dessa família de enzimas, existem outras endógenas como:

- **catalase:** uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 (BANTHORPE; HARBONE, 1994);

- **glutathione-peroxidase (GSH-Px):** catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois pela conversão da glutathione reduzida (GSH) a glutathione oxidada (GSSG) (BANTHORPE; HARBONE, 1994);

- **glutathione-reductase (GSH-Rd):** é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e recupera a glutathione reduzida (GSH) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997);

- **glutathione reduzida (GSH):** (L- γ -glutamyl-L-cisteinyl-glicina) é o tiol mais abundante no meio intracelular. É um dos agentes antioxidantes mais importantes protegendo as células

da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação e luz ultravioleta (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Uma definição ampla para o termo antioxidante é uma substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas com o substrato oxidado (por exemplo, a peroxidação lipídica), decai ou previne significativamente a oxidação do substrato (HALLIWELL *et al.*, 1995). Os antioxidantes podem agir em diferentes níveis no processo oxidativo: (1) aprisionamento de radicais de iniciação, (2) ligação a íons metálicos, (3) aprisionamento de radicais peroxilas, (4) remoção de biomoléculas danificadas pela oxidação (BRIVIBA; SIES, 1994). Na Figura 3 é mostrado um esquema de inter-relação entre os radicais livres e antioxidantes.

As segundas defesas não enzimáticas incluem os antioxidantes:

a) **Hidrossolúveis:**

- **Ácido ascórbico (vitamina C)**

É encontrado na maioria dos fluidos corporais na forma de ascorbato. Suas principais fontes são: brócolis, espinafre, tomate, alho, batata e frutas cítricas (BRIVIBA; SIES, 1994).

Atividade antioxidante: aprisiona $^1\text{O}_2$, $\text{HO}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet -}$, $\text{HO}_2^\bullet$, HOCl , reduz nitrosaminas carcinogênicas (ARUOMA, 1994; BRIVIBA; SIES, 1994).

- **Glutathione**

Age como substrato ou co-substrato em reações enzimáticas: glutathione S-transferase ou glutathione peroxidase, evitando o acúmulo de hidroperóxidos lipídicos. Age diretamente também com radicais livres e protege as células do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), $\text{HO}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet -}$. É sintetizado no organismo humano a partir do glutamato, cisteína e glicina (HALLIWELL, 1994; BRIVIBA; SIES, 1994).

Figura 3. Inter-relação entre os radicais livres e antioxidantes (ARUOMA, 1994).

b) Lipossolúveis:

- **Ubiquinona**

A forma predominante no organismo humano é a ubiquinona-10. Suas principais fontes são: óleo de soja, carnes, peixes migratórios (sardinha), gérmen de trigo e alguns vegetais como feijão, espinafre e alho (BRIVIBA; SIES, 1994).

Age como mediador entre dehidrogenases e citocromos da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais e participa na transferência de prótons através da membrana mitocondrial (SHAHIDI, 1997).

- **Vitamina E**

A vitamina E consiste de 4 tocoferóis e 4 tocotrienóis, sendo o maior antioxidante lipossolúvel de quebra de cadeia e também sequestrador de radicais peroxilas. O α -tocoferol é o tocoferol mais abundante e mais bioativo *in vivo*, seguida pelo γ -tocoferol. O grupo cromanol é o responsável pela atividade antioxidante, e a provável função da longa cadeia carbônica é reter a molécula na membrana. A estrutura do α -tocoferol está representada na Figura 4 (ARUOMA, 1994; BARBER; HARRIS, 1994). Suas principais fontes são: margarina, maionese, óleo vegetal, manteiga e ovos (ARUOMA, 1994).

Age contra os radicais livres como $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$, 1O_2 , radicais peroxilas lipídicos, $NO^{\bullet}$, $N_3^{\bullet}$, $Br_2^{\bullet}$, $CCl_3COO^{\bullet}$ (SHAHIDI, 1997).

Figura 4. Estrutura química do α -tocoferol.

- **Carotenóides e Retinóides**

O termo retinóides é genericamente usado para compostos sintéticos ou naturais os quais atuam como pró-vitamina A e agem sobre radicais peroxilas (ARUOMA, 1994).

Os carotenóides são: α - e β -caroteno e criptoxantina, e podem ser clivados enzimaticamente na mucosa intestinal e no fígado. Entre eles, o β -caroteno é um pigmento encontrado em todas as plantas e é o maior carotenóide precursor de vitamina A (BARBER; HARRIS, 1994). As suas principais fontes são: cenouras, tomates, uvas, feijões, brócolis, laranja e manga.

Age sobre $O_2^{\bullet-}$ e radicais peroxilas (ARUOMA, 1994).

As principais causas de um decréscimo da quantidade de antioxidantes em relação às espécies reativas do oxigênio podem ser (HALLIWELL, 1994; SIES, 1986):

- depleção de antioxidantes devido a má nutrição, por exemplo, a ingestão inadequada de ácido ascórbico e α -tocoferol (ARUOMA, 1994);
- produção excessiva de espécies reativas do oxigênio, por exemplo, pela exposição de concentrações elevadas de oxigênio molecular, na presença de toxinas, excessiva ativação do sistema de produção de radicais, como acontece nas células fagocitárias em doenças inflamatórias crônicas como colite ulcerativa ou artrite reumatóide (ARUOMA, 1994).

O excesso de espécies reativas do oxigênio está envolvido em danos ao DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos, ocorrendo em situações fisiológicas como no envelhecimento ou causando a patogênese de certas doenças humanas, entre elas, câncer, reperfusão-isquemia (infarto do miocárdio), doenças renais (nefrotoxicidade por aminoglicosídeos, síndromes nefróticas auto-imunes), cardiovasculares (aterosclerose), cerebrais (doença de Parkinson), visuais (dano degenerativo da retina, hemorragia ocular), gastrintestinais e hepáticas (injúria hepática por hidrocarbonetos halogenados, pancreatites induzidas por ácidos graxos livres, lesões do trato gastrintestinal induzidas por fármacos anti-inflamatórios), pulmonares (displasia bronco-pulmonar, hipóxia, enfisema), inflamatórias-imunes (artrite reumatóide, doenças auto-imunes) (ARUOMA, 1994; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, 1994).

1.2 FLAVONÓIDES: DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E IMPORTÂNCIA

Os flavonóides também são um grupo de substâncias antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis. Eles ocorrem em seu estado livre (sem a presença da ligação com açúcares) ou

em sua forma glicosídica, sendo denominados de aglicona e glicósidos, respectivamente (TREASE; EVANS, 1996; YAO *et al.*, 2004; ACKER *et al.*, 1996).

Os flavonóides que são derivados fenólicos compreendem um grande grupo de compostos químicos caracterizados por um esqueleto de carbono $C_6-C_3-C_6$, onde C_6 são estruturas de anéis aromáticos, conforme mostrada na Figura 5. Estão amplamente distribuídos em praticamente todas as partes das plantas, particularmente em células fotossintéticas, e também presentes em bebidas como o vinho tinto e a cerveja (YAO *et al.*, 2004; PATHAK *et al.*, 1991; BORS *et al.*, 1990).

A natureza química e as atividades bioquímicas dos flavonóides dependem de sua classe estrutural, grau de hidroxilação, outras substituições e conjugações, além do grau de polimerização (TREASE; EVANS, 1996; SHAHIDI, 1997).

Figura 5. Origem dos flavonóides e a representação do esqueleto de carbono $C_6-C_3-C_6$.

Este grande grupo de compostos está dividido em sub-classes e as mais importantes estão descritas na Tabela 1 e Figura 6 com exemplos de compostos representantes de cada uma e as suas respectivas fontes alimentares.

A atividade biológica dos flavonóides foi observada pela primeira vez em 1936 por Rusznyák e pelo bioquímico húngaro Albert Szent-Györgyi, em uma mistura de duas flavononas as quais diminuía a fragilidade e a permeabilidade capilar em humanos. Os flavonóides passaram a ser denominados de *vitamina P* (de permeabilidade), porém este termo foi abandonado por volta de 1950 devido à deficiência de flavonóides não causar

nenhuma síndrome em particular (RUSZNYÁK; SZENT-GYÖRGYI, 1936; HOLLMAN *et al.*, 1996; BORS *et al.*, 1990).

Como proteção em relação às plantas, os flavonóides podem agir contra danos causados pela radiação UV em folhas jovens, como antioxidantes, inibidores enzimáticos e promovendo resistência das plantas a patógenos, como os fungos, os insetos e as bactérias (HARBORNE, 1988; BANTHORPE; HARBONE, 1994).

Figura 6. As estruturas químicas das sub-classes dos flavonóides (RICE-EVANS *et al.*, 1995; HOLLMAN *et al.*, 1996; MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002).

Tabela 1 - Principais sub-classes dos flavonóides

Sub-classes	Cor	Flavonóides representativos	Fontes alimentares
Antocianidina	Azul, vermelho, violeta	Cianidina	Frutas e flores
Flavanol	Incolor	Catequinas, epicatequinas	Maçãs, chá, cerveja
	Amarelo	Procianidina	Sucos de frutas, vinho
Flavanona	Incolor, amarelo	Hesperidina, naringenina	Frutas cítricas
Flavona	Amarelo claro	Apigenina, luteolina	Cereais, frutas, flores, vegetais
Flavonol	Amarelo claro	Quercetina, miricetina, rutina	Cebolas, maçãs, tomates, vinho tinto, trigo sarraceno, chá.
Isoflavona	Incolor	Genisteína, daizeína	Legumes (derivados de soja)

Fonte: Acker *et al.*, (1996)

Há a existência de flavonóides amarelos, vermelhos e azuis e por isso são responsáveis pela cor das flores, frutas e algumas folhas. Quando não são diretamente visíveis, a sua contribuição em relação à cor se dá através da co-pigmentação de flavonóis os quais protegem as antocianinas. Em alguns casos as moléculas absorvem próximo da radiação UV, onde esta “cor” só é percebida pelos insetos que são atraídos e guiados ao néctar (BROUILLARD *et al.*, 1989; HARBORNE, 1988; SHAHIDI, 1997).

As flavonas, que é um sub-grupo dos flavonóides, dão características amareladas a planta (*flavus* = amarelo) e são comumente encontradas em tecidos jovens de plantas desenvolvidas, sendo bastante abundantes em plantas das seguintes famílias: *Polygonaceae*, *Rutaceae*, *Leguminosae*, *Umbelliferae* e *Compositae* (TREASE; EVANS, 1996; BRUNETON, 1999).

Além disso, a importância dos flavonóides em plantas se estende também à marcação taxonômica, devido a sua abundância relativa em quase todo o reino vegetal, especificidade em algumas espécies, seu acúmulo com menor influência do meio ambiente e uma relativa

facilidade de identificação e estabilidade (BRUNETON, 1999; BANTHORPE; HARBONE, 1994; SHAHIDI, 1997).

As suas principais aplicações nas indústrias são como corantes, aromatizantes e flavorizantes. Além disso, as pesquisas realizadas nas últimas décadas em relação aos flavonóides demonstraram o seu envolvimento com propriedades farmacológicas importantes como antioxidantes (RICE-EVANS *et al.*, 1995), vasodilatadoras (DUARTE *et al.*, 1993), anti-inflamatórias (PATHAK *et al.*, 1991), estimulante do sistema imunológico, anti-alérgicas, anti-virais, anti-bactericidas (MIDDLETON; KANDASWAMI, 1992), anticarcinogênicas e cardioprotetoras (PATHAK *et al.*, 1991; HOLLMAN *et al.*, 1996; MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002).

Outros estudos realizados mostram as suas propriedades em relação a quimio-prevenção do câncer, atuando na inibição em fases do ciclo celular, proliferação celular, estresse oxidativo, indução na desintoxicação das enzimas, apoptose e ativação do sistema imunológico. Uma outra pesquisa é sobre a sua função como protetor das doenças do coração prevenindo a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade para a formação aterogênica, através da diminuição da adesão e agregação de plaquetas e propriedades vasodilatadoras (YAO *et al.*, 2004; MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002).

Os flavonóides representados na Figura 7, como flavonóide reduzido (Fl—OH) e flavonóide oxidado (Fl—O[•]) previnem a peroxidação lipídica através de aprisionamento de radicais de iniciação da peroxidação lipídica (Reação I e II da Figura 7), entre eles, (a) O₂^{•-}, OH[•], ¹O₂; (b) ligação a íons metálicos, podendo complexarem-se com íons de ferro e suprimir a reação de Fenton (Reação III e IV da Figura 7); (c) aprisionamento de radicais peroxilas lipídicos; (d) inibição do sistema enzimático responsável pela produção de radicais livres (AFANAS'EV *et al.*, 1989; ACKER *et al.*, 1996; ARORA *et al.*, 1998).

Figura 7. Reação dos flavonóides como antioxidantes e anti-radicais livres (AFANAS'EV *et al.*, 1989).

A atividade de seqüestro de radicais livres dos flavonóides se dá pela rápida doação de um átomo de hidrogênio aos radicais, e depende da sua estrutura molecular (Figura 8) substituição feita nos grupos hidroxilas, e da possibilidade de estabilização dos radicais fenoxilas formados via ligação com hidrogênio ou pelo deslocamento expandido de elétrons (AMIC' *et al.*, 2003).

No primeiro caso, se os compostos tiverem grupos hidroxilas na posição 3' e 4' do anel B e/ou na posição 7 e 8 do anel A, a sua atividade anti-radical é bastante aumentada. Portanto o número e localização das hidroxilas fenólicas são fatores muito importantes para a eficácia da atividade anti-radical (AMIC' *et al.*, 2003).

O segundo caso ocorre entre a dupla ligação conjugada entre C₂-C₃ com um grupo 4-ceto, o qual é responsável pelo deslocamento de elétrons do anel B. Se houver uma associação desta dupla com a presença de hidroxilas na posição 3 e 5, há um aumento dessa atividade (AMIC' *et al.*, 2003; JOVANOVIĆ *et al.*, 1994; BORS *et al.*, 1990; LIEN *et al.*, 1999).

Em síntese, a estrutura molecular dos flavonóides contribuem para a geração de radicais ou intermediários estáveis (radicais fenoxilas) terminando assim a reação em cadeia.

Figura 8. Regiões estruturais dos flavonóides com uma alta atividade de seqüestro de radicais livres (AMIC *et al.*, 2003).

Os estudos dos flavonóides por espectrofotometria UV têm revelado que a maioria dos flavonóis exibe 2 bandas de absorção: Banda I (320-385 nm) que representa a absorção do anel B e a Banda II (250-285 nm) que corresponde à absorção do anel A, conforme representado na Figura 8 (YAO *et al.*, 2004; JOVANOVIĆ *et al.*, 1994).

1.3 ORIGEM BIOSINTÉTICA, FONTES NATURAIS E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DA RUTINA

Nas últimas décadas, as atividades farmacológicas da rutina que é um bioflavonóide pertencente ao sub-grupo dos flavonóis têm sido intensamente pesquisadas e os seus resultados estão interessando constantemente as indústrias farmacêuticas.

O principal objetivo deste trabalho foi sintetizar derivados hidrossolúveis da rutina melhorando sua solubilidade em água, além da contribuição com estudos de atividade antioxidante e seqüestramento de radicais livres.

Entre as importâncias terapêuticas da rutina, está a melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, por promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede destes

vasos. Outros sintomas de fragilidade capilar também são melhorados, entre eles, estão o da perda da acuidade visual e alterações do campo visual. Estes efeitos podem ser dela sozinha ou associada ao ácido ascórbico, inclusive a absorção deste último composto sendo melhorada quando administrado junto com a rutina (PATHAK *et al.*, 1991).

Em estudos realizados em íleos de cobaios por Yildizoglu (1991) e colaboradores, eles puderam observar a ação da rutina como sendo um inibidor não competitivo da angiotensina II e prostaglandina E₂. Há estudos também onde foram observados em cólon de cobaio, a atividade de relaxamento do músculo liso, podendo ser estas as razões da melhora da permeabilidade capilar produzida pela rutina.

Segundo os estudos de Afanas'ev (1989) e colaboradores, ao pesquisarem a atividade antioxidante da rutina e da quercetina, concluíram que estes flavonóides têm uma ação terapêutica em patologias que envolvam radicais livres, e não são tóxicos, em especial a rutina. Podem inibir o processo de formação de radicais livres em vários estágios, por reagirem com o íon superóxido e radicais peroxilas lipídicos, e por formarem um complexo com o ferro, que é um catalisador da formação de radicais de oxigênio ativo (PATHAK, 1991; YOKOZAWA *et al.*, 1997).

As fontes alimentares que contém a rutina incluem as cebolas, a uva, o trigo sarraceno e também bebidas como o vinho tinto (THOMSON; BLOCH; HASLER, 1999; HOLLMAN; HERTOOG; KATAN, 1996). Apesar dela ser relativamente bem distribuídas nas plantas, somente um pequeno número destas fontes contém quantidades suficientes para a extração em escala industrial (OOMAH; MAZZA, 1996).

As principais fontes de rutina são:

- **A árvore japonesa pagoda** – *Sophora japonica* L., Fabaceae: uma árvore encontrada no norte e centro da China, e de seus botões e flores são extraídos de 15 a 20% de rutina (HARBORNE, 1988);

- **Trigo sarraceno** – *Fagopyrum esculentum* Moench, *F. tataricum* (L.) Gaertn., Polygonaceae: é um pseudocereal de origem chinesa, cultivado na Europa, e suas folhas contém de 2-8% de rutina dependendo de suas variações (COUCH; NAGHSKI; KREWSON, 1946; OOMAH; MAZZA, 1996);
- **frutos (favas) do faveiro** – *Dimorphandra mollis* Benth, Fabaceae: uma árvore pequena e mediana de porte tortuoso, conforme representada na Figura 9. Contém rutina na proporção de 8g para 100g de pericarpo (CHAVES; USBERTI, 2003). É uma espécie arbórea nativa do Brasil pertencente à família Caesalpiniaceae, encontrada em regiões de cerrado nos estados do Pará, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul e ainda na Caatinga nordestina.

As sementes do fruto também são ricas em polissacarídeos como o galactomano, uma mistura de manose e galactose na proporção de 2:7, muito utilizado como espessante em alimentos (CHAVES; USBERTI, 2003).

Figura 9. Faveiro (*Dimorphandra mollis* Benth.) – árvore nativa do Brasil e fonte de rutina.

Por ser um flavonóide, a origem biossintética da rutina nestas plantas inicia-se a partir da combinação das duas principais vias de conversão aromática dos compostos fenólicos:

- via shiquimato (Figura 10a) – conversão de monossacarídeos em aminoácidos aromáticos, primeiramente transformando-se em ácido prefênico (Figura 10b) e depois em há a

conversão em fenilalanina (Figura 11a) no caso dos flavonóides, e por desaminação em ácido cinâmico (Figura 11b) (LEHINGER; NELSON; COX, 1995);

- inicia-se com acetato e transforma-se por ciclização (Figura 10b) – condensação aldólica ou Claisen, em poli- β -cetoésteres de tamanhos variados (LEHINGER; NELSON; COX, 1995).

Figura 10. Via shiquimato – via de conversão aromática dos compostos fenólicos.

O mecanismo de um dos processos de elongação do composto fenilpropanóico (ácido cinâmico – Figura 11c) ocorre neste convertendo-se em um éster de coenzima A e juntando-se a três unidades de malonil-coenzima A (Figura 11b), formando os flavonóides, um principal grupo que apresenta 15 átomos de carbono na sua estrutura, onde há 2 anéis benzênicos ligados a uma cadeia de 3 carbonos (Ar-C₃-Ar): 1,3-diarilpropano, como mostrado na Figura 11d (KHALIFA; MUHTADI; HASSAN, 1983; YAO *et al.*, 2004; LEHINGER; NELSON; COX, 1995).

A classificação dos flavonóides dependerá do grau de oxidação do anel pirano central (unidade C₃), no caso dos flavonóis há uma hidroxila ligada na posição 3 deste anel (Figura 12a). A quercetina (Figura 12b) é a molécula pelo qual a rutina (Figura 12c), que é um dos representantes escolhidos desta sub-classe, deriva e há uma ligação glicosídica na posição 3 do anel pirano central (BRUNETON, 1999; KHALIFA; MUHTADI; HASSAN, 1983; LEHINGER; NELSON; COX, 1995).

Figura 11. Processo de formação dos flavonóides, um principal grupo que apresenta 15 átomos de carbono na sua estrutura.

Figura 12. Formação da rutina a partir da quercetina – pertencentes a sub-classe dos flavonóis.

A tecnologia descrita nesta pesquisa aplicada para o aumento da solubilidade em água da rutina fundamentou-se no trabalho de um grupo de pesquisa francês formado por Alluis, Pérol, El hajji e Dangles (2000), que enfocaram a síntese de derivados hidrossolúveis de rutina introduzindo grupos carboxilatos e sulfatos nas hidroxilas dos grupamentos glicosídicos utilizando várias concentrações de anidrido succínico utilizando como catalisador o DMAP (N,N-dimetilpiridin-4-amina) e como solvente a piridina a 70 °C, sem promover acilação nas hidroxilas do anel flavonóide nestas condições.

Neste trabalho foi realizada a síntese de conversão dos grupos hidroxilas do dissacarídeo da molécula de rutina a grupos ésteres, através de uma modificação da técnica usada pelo grupo de pesquisa citado, introduzindo grupos carboxilatos provenientes de um excesso de anidrido succínico, ftálico e 2-fenilglutárico, respectivamente, e utilizando uma base fraca

como a piridina a 70 °C, sem promover modificações significativas no núcleo flavonóide. Durante a síntese dos derivados da rutina não foram utilizados o catalisador (DMAP) nem o agente secante (carbonato de cálcio) resultando em produtos com alta solubilidade em água.

Em geral os flavonóides que apresentam ligações glicosídicas são solúveis em meio aquoso e etanólico, são mais solúveis em água do que as agliconas (a quercetina por exemplo) devido apresentarem um número maior de grupos de hidroxilas livres. Um pequeno número de compostos são parcialmente solúveis em água como é o caso da rutina e hesperidina, limitando as suas aplicações. Visando promover um aumento na solubilização em meio aquoso destes compostos muitos estudos vem sendo realizados como a introdução de grupos sulfatos e carboxilatos nos açúcares da rutina (ALLUIS *et.al.*, 2000) (Figura 13a), conjugações de inositol fosfato via ligação de um diéster succinato na posição 3 e 5 da quercetina (CALIAS *et.al.*, 1996) (Figura 13b) e sulfonação da quercetina (MAZUR *et al.*, 2004) (Figura 13c). Estes grupos polares aumentam a interação com a água através da formação de pontes de hidrogênio.

Figura 13. Síntese de derivados hidrossolúveis da rutina e quercetina.

A síntese de derivados da rutina que atendam estas características de uma maior solubilidade em água sem haver perdas significativas em suas atividades biológicas e implicaria em vantagens como:

- uma melhora em suas características físicas podendo ser utilizada em formas farmacêuticas para uso externo (cremes, géis, pomadas, *sprays*, membranas para liberação controlada de fármacos) mantendo as suas atividades antioxidantes da rutina de partida;
- redução da degradação intestinal, pois as enzimas da microflora do cólon promovem extensa hidrólise das ligações dos glicosídeos flavonoídicos e sua subsequente degradação a agliconas sendo excretados rapidamente na forma de ácidos fenilacéticos, principalmente em ácido 3-hidroxifenilacético (36%) (MANACH *et. al.*, 1997; OLTHOF *et.al.*, 2003; KATAN *et al.*, 2003; WALLE, 2004). Com a modificação química na molécula de rutina, haveria uma diminuição de sua degradação, porém com relação a sua absorção poderia ocorrer um processo mais lento que aconteceria por um mecanismo de transporte ativo de absorção e não por um transporte passivo como seria no caso da quercetina, por ser uma forma aglicona e uma molécula menor.

Como este assunto de biodisponibilidade dos flavonóis é muito controverso ainda, alguns autores como Alluis, Pérol, El hajji e Dangles (2000), estudam as características de

solubilidade da rutina associada a sua biodisponibilidade, diminuindo o grau de succinilação da rutina e tornando-a menos susceptível à degradação pelas enzimas intestinais.

Uma última vantagem com relação ao aumento de solubilidade, seria uma melhora da propriedade de estabilização de cores naturais que os flavonóis apresentam por formar complexos moleculares com pigmentos das plantas (antocianinas), um fenômeno conhecido como copigmentação. Esta reação é limitada pela baixa solubilidade em água dos flavonóis (BROUILLARD *et al.*, 1989).

1.4 LIPOPEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

O estresse oxidativo foi definido segundo SIES (1986) e HALLIWELL (1995), como um balanceamento não adequado entre a produção de espécies reativas do oxigênio e mecanismos dos antioxidantes. Uma das consequências deste desequilíbrio é a reação dessas espécies com ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, iniciando um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (SMITH; ANDERSON, 1987; FERNÁNDEZ *et al.*, 1997; JANERO, 1990).

A membrana é o componente celular mais atingido pela peroxidação lipídica, acarretando alterações em sua estrutura e permeabilidade, e além disso podemos ter as seguintes situações: (a) perda de seletividade na troca iônica, (b) liberação do conteúdo das organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, (c) formação de produtos citotóxicos, como o malonaldeído, (d) morte celular (FERNÁNDEZ *et al.*, 1997; BOTSOGLOU *et al.*, 1994).

Nos sistemas biológicos a lipoperoxidação pode ocorrer principalmente por uma via enzimática envolvendo as ciclo-oxigenases e lipoxigenases e por outra via não enzimática

envolvendo a participação das espécies reativas do oxigênio, metais de transição e outros radicais livres (PORTER; CALDWELL; MILLS, 1995; JANERO, 1990).

Este processo conforme descrito por PORTER (1984) e HALLIWELL (1994), pode ser dividido principalmente em três etapas, e o seu mecanismo estrutural está representado na Figura 14:

- INICIAÇÃO: os ácidos graxos poli-insaturados sofrem uma reação de oxidação por um oxigênio reduzido parcialmente gerado em uma das duas vias de produção formando um radical alquila ($L^{\bullet}$), o qual se combina com o oxigênio formando um radical peroxila ($LOO^{\bullet}$) (JANERO, 1990; GUILLÉN-SANS; GUZMÁN-CHOZAS, 1998);

- PROPAGAÇÃO: este radical peroxila pode reagir com outro ácido graxo gerando outro radical alquila ($L^{\bullet}$) e hidroperóxido lipídico ($LOOH$). Os íons de metais de transição também podem participar do processo a partir destes hidroperóxidos e formar radicais lipídicos alcóxila ($LO^{\bullet}$), peroxila ($LOO^{\bullet}$) e hidroxila ($OH^{\bullet}$) (JANERO, 1990; GUILLÉN-SANS; GUZMÁN-CHOZAS, 1998);

- TERMINAÇÃO: a reação de um radical com outro originando produtos não radicalares. Os radicais peroxila e alcóxila também podem se ligar com resíduos de aminoácidos ou sofrerem um rearranjo formando produtos secundários da lipoperoxidação como derivados hidroxi-, ceto-, cetohidroxi- e epóxi-hidroxi-ácido graxo (LIMA; ABDALLA, 2001; GUILLÉN-SANS; GUZMÁN-CHOZAS, 1998).

Figura 14. Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica (LIMA; ABDALLA, 2001; SMITH; ANDERSON, 1987; GUILLÉN-SANS; GUZMÁN-CHOZAS, 1998).

1.5 MÉTODOS PARA A AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

As principais metodologias utilizadas para a avaliação da lipoperoxidação em sistemas biológicos medem a formação de produtos gerados durante as diferentes fases deste processo. Alguns métodos são: detecção dos dienos conjugados (hidroperóxidos conjugados), detecção do 4-hidroxinonenal (aldeído insaturado formado pela peroxidação de ácidos graxos ômega-6), detecção dos isoprostanos (derivados da oxidação de ácidos graxos por via enzimática: derivados do ácido araquidônico), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por quimiluminescência (mensuração de hidroperóxidos lipídicos), entre outros (LIMA; ABDALLA, 2001; SMITH; ANDERSON, 1987; LOGANI; DAVIES, 1979).

1.5.1 A peroxidação lipídica e o teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)

Um extenso estudo vem sendo feito desde o ano de 1949 em relação a avaliação da peroxidação lipídica em sistemas biológicos e em alimentos, utilizando o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) em condições ácidas. Isto foi comprovado por WILBUR et al. (1949) quando foi demonstrado que a oxidação aeróbica do homogenato de cérebro incubado gerava uma substância que reagia com o ácido 2-tiobarbitúrico e formava um produto de coloração vermelha estável a um comprimento de onda de 532 nm. A quantidade do produto formado era proporcional à quantidade de peróxidos e consumo de oxigênio durante a autooxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (FERNÁNDEZ *et al.*, 1997).

Este produto de coloração vermelha foi o foco do estudo a partir desta data, sendo evidenciado que esta substância poderia ser um aldeído por possuir um grupamento carbonila necessário para a reação com o ácido 2-tiobarbitúrico.

Sinnhuber e colaboradores em 1958 cristalizaram um produto vermelho formado da autooxidação do óleo de peixe no teste do TBA e compararam suas propriedades físicas e químicas com o pigmento vermelho gerado pela reação do padrão de malondialdeído (MDA), que é o 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) com o TBA. Esta comparação de propriedades indicou que o espectro de absorção no visível, composição elementar, peso molecular e solubilidade foram as mesmas.

Com o progresso das pesquisas em relação ao teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), esta técnica é ainda uma das mais utilizadas para se avaliar a oxidação de lipídeos e trata-se da reação do TBA com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Um dos principais produtos secundários formado durante a lipoperoxidação por cisão *beta* dos ácidos graxos poli-insaturados peroxidados é o malondialdeído (MDA). É um

aldeído volátil, baixo peso molecular ($C_3H_4O_2$) e um ácido moderadamente fraco ($pK_a = 4,46$) (LOGANI; DAVIES, 1979; JANERO, 1990).

Em solventes orgânicos, soluções aquosas ($pH \leq 3$) e em fase gasosa, o malondialdeído é inteiramente enolizado formando pontes de hidrogênio intramoleculares (Figura 15b e 15d) com baixa barreira de interconversão para a estrutura ressonante onde a ligação ponte de hidrogênio é simétrica (Figura 15c). Já em soluções aquosas ($pH \geq 7$) é favorecida a formação da conformação *s-trans*, o qual existe como base conjugada (ânion enolato), Figura 15e (JANERO, 1990; FERNÁNDEZ *et al.*, 1997; LOGANI; DAVIES, 1979).

Figura 15. Estrutura química de malondialdeído mostrando as suas formas em diversas faixas de pH (FERNÁNDEZ *et al.*, 1997; JANERO, 1990).

O enol ácido livre não carregado de malondialdeído é mais reativo que a base conjugada, podendo reagir como nucleófilo ou como eletrófilo e forma cadeias multiméricas. Essas propriedades estão associadas à natureza instável do malondialdeído puro, o qual participa de reações de alto-condensação tipo aldol gerando polímeros de baixo peso molecular e baixa polaridade. Em condições como pH baixo e aquecimento, o malondialdeído participa em reações de adição e cicloadição com nucleófilos, gerando uma grande variedade

de produtos de condensação. Todos estes produtos formados absorvem em regiões do visível e UV (JANERO, 1990; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Neste ensaio uma molécula de malondialdeído reage com duas moléculas de ácido 2-tiobarbitúrico para formar um complexo de cor vermelha (Figura 16), o qual absorve a 532-535nm e apresenta máximos de absorção secundários a 245 a 305nm. A reação ocorre em meio ácido (pH 1-2) e a alta temperatura (100 °C), no sentido de aumentar a sua velocidade e sensibilidade (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; BOTSOGLOU *et al.*, 1994).

Figura 16. Formação de um composto fluorescente vermelho 1:2 (MDA:TBA) pelo mecanismo de adição nucleofílica catalisada por um meio ácido e alta temperatura.

Alguns fatores importantes que influenciam este teste devem ser considerados, entre eles:

- temperatura e pH: o desenvolvimento de uma máxima coloração (formação dos peróxidos de ácidos graxos) se dá a uma alta temperatura (80-100 °C), em meios ácidos por um período de tempo variando entre 10 minutos a 1 hora (JANERO, 1990);
- metais de transição: podem ser catalisadores da reação de oxidação dos ácidos graxos formando hidroperóxidos (BOTSOGLOU *et al.*, 1994);
- a não especificidade do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) para a reação com o malondialdeído, pois há a possibilidade da formação do complexo de TBA com outros produtos intermediários aldeídicos formados em menores concentrações. Porém o malondialdeído é formado em maior concentração e na faixa de comprimento de onda de 532-535 nm, que é quando o máximo de sua absorção ocorre e é possível distinguir o complexo MDA:TBA dos outros produtos

reativos ao ácido tiobarbitúrico por espectrofotometria (JANERO, 1990; GUILLÉN-SANS; GUZMÁN-CHOZAS, 1998).

O potencial do malondialdeído para causar dano ao tecidos *in vivo* está relacionado a sua afinidade pelos grupos aminos primários das proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídeos, alterando estas biomoléculas e sendo responsáveis pelas suas propriedades de toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade, além de participar de outros processos patogênicos como a formação de pigmentos fluorescentes típicos do envelhecimento celular (JANERO, 1990; BOTSOGLOU *et al.*, 1994; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

1.6 MÉTODOS PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE SEQÜESTRO DE RADICAIS LIVRES EM ALIMENTOS E SISTEMAS BIOLÓGICOS

Os diversos métodos destinados à avaliação da capacidade de seqüestro de radicais livres propostos na literatura variam tanto quanto ao tipo de radicais livres gerados, quanto ao indicador de oxidação escolhido e, quanto ao método usado para a sua detecção e quantificação (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Os radicais livres podem ser gerados através de processos físico-químicos, químicos ou enzimáticos. Os métodos físico-químicos utilizam técnicas como a fotólise ou a oxidação fotodinâmica. Métodos químicos incluem sistemas de Fenton, que contém um agente redutor e um íon metálico, termólise de azo-iniciadores e autooxidação da hemina. Sistemas enzimáticos utilizam freqüentemente as reações de xantina oxidase e de NAD(P) oxidase (HAUPTMANN; CADENAS, 1997).

Uma revisão dos principais métodos utilizados tanto em alimentos quanto em sistemas biológicos para a determinação de seqüestro de radicais livres foi feita por Sánchez-Moreno (2002) e o seu esquema resumido encontra-se na Figura 17 e estando explicados logo abaixo:

Figura 17. Resumo dos radicais livres gerados nos métodos para a avaliação da atividade de sequestro de radicais livres, onde foi dada ênfase aos radicais peróxilas (ROO[•]) mostrando os principais compostos azo-iniadores usados.

1.6.1 Metodologias empregadas para a geração e sequestro de radicais livres

(a) Geração de radicais superóxido (O₂^{•-})

Os radicais superóxidos são gerados por um sistema hipoxantina-xantina oxidase (principal fonte enzimática de espécies reativas do oxigênio *in vivo*). Também pode ser gerado usando uma reação não-enzimática de metossulfato fenazina na presença de NADH e oxigênio molecular (HALLIWELL *et al.*, 1995).

(b) Geração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Estes radicais são gerados através de ensaios baseados na reação direta de H₂O₂ e titânio (IV) em extratos de chás, sucos de frutas (morangos, cerejas), onde é medido o decaimento da concentração de peróxido de hidrogênio (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

(c) Geração de ácido hipocloroso (HOCl)

A avaliação pode ser feita utilizando uma mistura reacional de mieloperoxidase/H₂O₂/cloreto de sódio como fonte de ácido hipocloroso, e a inibição desta substância é realizada em extratos de antioxidantes (HALLIWELL *et al.*, 1995).

(d) Geração de radicais hidroxilas (OH[•])

A formação do radical hidroxila (HO[•]) se dá por uma mistura de ácido ascórbico/H₂O₂/Fe³⁺ - EDTA. Os radicais não seqüestrados pelo composto em análise atacam a desoxirribose presente no meio, promovendo a sua degradação. Este método é também muito usado para a avaliação da atividade pró-oxidante de compostos (HALLIWELL *et al.*, 1995; SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

(e) Geração de radicais peroxilas (ROO[•])

Utiliza os azo-compostos para gerar radicais peroxilas, como o método TRAP (*Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*) e o método ORAC (*Oxygen-Radical Absorbance Capacity*).

O grupo de pesquisa de Wayner *et al.*, (1985) introduziu o ensaio de TRAP para a determinação da atividade antioxidante no plasma humano. Este método consiste na geração de radicais peroxilas numa taxa controlada por decomposição térmica de azo-iniciadores hidrossolúveis, como ABAP (hidrocloridrato de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano) ou AAPH (dihidrocloridrato de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano) (Figura 17A e 17B). O período de indução, no qual a oxidação é inibida por antioxidantes no plasma, é comparado com o Trolox (análogo hidrossolúvel do α -tocoferol) usado como padrão de antioxidante hidrossolúvel e então é relatada quantitativamente a capacidade antioxidante do plasma. A reação do Trolox com radicais peroxilas é mostrada na Figura 18 (ROMAY *et al.*, 1996; SÁNCHEZ-MORENO, 2002; LISSI *et al.*, 1995).

Figura 18. Reação do Trolox (ácido 6-hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-óico) com radicais peroxilas.

Em amostras oleosas, os radicais peroxilas são gerados por compostos azo-iniciadores lipofílicos como o AMNV (2,2'-azo-bis-2,4-dimetilvaleronitrila) (Figura 17C), onde a capacidade antioxidante total do óleo é determinada pelo consumo de oxigênio consumido medido por um eletrodo do tipo Clark. Neste método, TRAP é determinado pela avaliação da duração do tempo que o oxigênio gerado é inibido (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; HALLIWELL *et al.*, 1995).

Já no ensaio de ORAC há a combinação do tempo de inibição e porcentagem de inibição da ação de radicais livres por antioxidantes usando a área abaixo da curva para a quantificação do teste. Os geradores de radicais livres utilizados são:

- AAPH (ORAC_{ROO•}) gerando radicais peroxilas;
- cobre (II)-H₂O₂ gerando radicais hidroxilas;
- cobre (I) (ORAC_{Cu}), sendo um oxidante de metal de transição.

Este teste expressa o resultado em unidades de ORAC ou equivalentes Trolox, o qual corresponde à quantidade de micromoles de Trolox que têm a mesma atividade antioxidante que um litro de solução ensaiada. No caso do cobre (II) sozinho usado como oxidante no ensaio, o Trolox não pode ser usado como padrão antioxidante pois ele pode agir como pró-oxidante na presença de cobre (II) (ROMAY *et al.*, 1996; SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

(f) Geração do cátion radical ABTS^{•+} (2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato) ou também conhecido como método TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)).

No ensaio proposto por Miller e Rice-Evans (1997) obtém-se o radical cátion $ABTS^{\bullet+}$, a partir do ácido 2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS) e em presença de H_2O_2 , o qual apresenta máximos de absorção a 415, 660, 734 e 820 nm. Na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, pode medir-se a diminuição da formação deste radical por espectrofotometria.

(g) Geração do radical estável DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

O método de Brand-Williams, Bondet e Berset (1997) tem por base a redução do radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]) em solução de metanol ou etanol, o qual apresenta um máximo de absorção a 515-528 nm. Ao fixar um H[•], abstraído ao antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição na absorbância, o que permite calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH[•].

(h) Geração do radical cátion DMPD (N,N-dimetil-*p*-fenilenediamina)

Este composto hidrofílico na presença de uma solução oxidante (cloreto férrico) em pH ácido é convertido em um cátion radical (DMPD^{•+}) estável e colorido. O espectro UV-visível deste composto apresenta uma absorbância máxima de 505nm.

1.6.2 Avaliação da atividade de seqüestros de radicais peroxila usando azo-iniciadores

O radical peroxila é um radical livre encontrado em substratos biológicos, participando da propagação da lipoperoxidação e sendo bastante utilizado em ensaios de antioxidantes. Ele é menos reativo que o radical hidroxila e sua meia-vida é um pouco maior (HALLIWELL *et al.*, 1995; LISSI *et al.*, 1995).

Há uma variedade de métodos desenvolvidos para avaliar a formação, propagação e a ação de radicais livres em modelos simplificados *in vitro*, devido a falta de sensibilidade,

especificidade e adaptabilidade em células humanas (LISSI *et al.*, 1992; KRASOWSKA *et al.*, 2001).

A quimiluminescência é a geração de luz na forma de fótons através da liberação de energia por uma reação química. Técnicas quimiluminescentes têm sido amplamente utilizadas no desenvolvimento de sistemas analíticos para substâncias com interesse clínico. Elas oferecem vantagens consideráveis sobre os métodos convencionais como grande sensibilidade com instrumentos relativamente simples, rápida obtenção de dados analíticos e linearidade da resposta luminescente (KRASOWSKA *et al.*, 2000; BASTOS *et al.*, 2003).

Este método permite não somente a avaliação dos produtos finais da reação dos constituintes celulares como radicais livres, mas serve também para a observação da cinética da reação. É necessário serem utilizados reagentes quimiluminescentes, como lucigenina, isoluminol e luminol, os quais são excitados pela reação com os radicais livres e têm um alto campo quântico de emissão de fótons (KRASOWSKA *et al.*, 2000; KRASOWSKA *et al.*, 2001).

O luminol é o mais freqüentemente utilizado por atravessar membranas biológicas e torna-se uma fonte de luz após a sua excitação por diferentes tipos de radicais livres, incluindo radicais peroxilas. Em meio alcalino, o luminol sofre uma dupla ionização, o qual se oxida no estado triplete (dois elétrons com o mesmo *spin*) pela reação com radicais peroxilas. Logo após passa para um estado de energia menor, singlete excitado (dois pares de elétrons com *spins* opostos), que decaem para o estado fundamental através da emissão de um fóton. A reação simplificada é mostrada na Figura 19 (WAYNER *et al.*, 1985; LISSI *et al.*, 1992).

Figura 19. Reação do luminol com radicais alquil-peroxilas em meio alcalino para a geração de luz.

Métodos analíticos relacionados ao fato da quimiluminescência do luminol ser induzida por radicais livres, ou processos de oxirredução, avaliam diferentes tipos de espécies ativas de oxigênio e a especificidade e eficiência de aditivos seqüestradores destes radicais. Dados obtidos no estudo da emissão do luminol induzida pelos radicais superóxido, hidroxil, alcoxil e hidroperoxil, e oxigênio singlete, mostram que existe um grau de especificidade em relação a um determinado aditivo, dependendo da espécie de oxigênio ativo que se forma inicialmente no meio de reação (LISSI *et al.*, 1992; BASTOS *et al.*, 2003).

Pela simplicidade do método, utiliza-se como iniciadores de radicais livres os compostos azo, que pela sua decomposição térmica reagem rapidamente com o oxigênio originando radicais peroxilas e nitrogênio. Estes atuam sobre um substrato lipídico desencadeando um processo de lipoperoxidação, em relação ao qual se escolhe um determinado indicador, como consumo de oxigênio, desaparecimento do substrato lipídico, aparecimento de produtos de oxidação, que se observa e quantifica antes e após a adição de um composto antioxidante (avaliação da atividade de seqüestro de radicais livres) (SILVA *et al.*, 1999; BASTOS *et al.*, 2003; ROMAY *et al.*, 1996).

Além disso, pode-se recorrer à sua redução gerando radicais livres estáveis *in vitro* para avaliar a atividade de seqüestro de radicais livres em meio hidrofílico.

O ABAP (cloridrato de 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) e o AAPH (dihidrocloridrato de 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) são freqüentemente usados como fontes de radicais alquil-peroxilas hidrofílicos. O AAPH tem uma meia-vida de aproximadamente 175 horas em água (pH 7) e temperatura de 37 °C, e a geração de radicais é constante nas primeiras horas (LISSI *et al.*, 1992; KRASOWSKA *et al.*, 2000).

Esta taxa de geração de radicais livres a partir do AAPH a 37 °C equivale a $1,36 \times 10^{-6}$ mol. L⁻¹ s⁻¹ (NIKI, 1990).

O ensaio TRAP (*Total Radical Antioxidant Parameter*) cujo método baseia-se na reação de oxidação do luminol pelos radicais peroxilas formados pela termólise de AAPH resultando em uma emissão quimiluminescente. Antioxidantes na amostra inibem esta quimiluminescência por um tempo diretamente proporcional à concentração total de aditivo. A reação de termólise gerando radicais peroxilas é mostrada na Figura 20 (LISSI *et al.*, 1992; LISSI *et al.*, 1995; ROMAY *et al.*, 1996).

O valor obtido é, então, comparado com o antioxidante padrão, Trolox (derivado hidrossolúvel do α -tocoferol), e reportado como a capacidade antioxidante da amostra (LISSI *et al.*, 1995; ROMAY *et al.*, 1996).

Figura 20. Termólise do AAPH (dihidrocloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano) gerando nitrogênio e dois radicais alquilas, os quais reagem com o oxigênio formando radicais peroxilas.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 SÍNTESE QUÍMICA, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS DERIVADOS HIDROSSOLÚVEIS DA RUTINA

A tecnologia descrita nesta pesquisa aplicada para o aumento da solubilidade em água da rutina fundamentou-se no trabalho de um grupo de pesquisa francês formado por Alluis, Pérol, El hajji e Dangles (2000). Estes pesquisadores enfocaram a síntese de derivados hidrossolúveis de rutina introduzindo grupos carboxilatos e sulfatos nas hidroxilas dos grupamentos glicosídicos utilizando várias concentrações de anidrido succínico utilizando como catalisador o DMAP (N,N-dimetilpiridin-4-amina) e como solvente a piridina a 70 °C, sem promover acilação nas hidroxilas do anel flavonóide nestas condições.

Neste trabalho foi realizada a síntese de conversão dos grupos hidroxilas do dissacarídeo da molécula de rutina a grupos ésteres, através de uma modificação da técnica usada pelo grupo de pesquisa citado, introduzindo grupos carboxilatos provenientes de um excesso de anidrido succínico (Figura 21), ftálico (Figura 22) e 2-fenilglutárico (Figura 23), respectivamente, e utilizando uma base fraca como a piridina a 70 °C, sem promover modificações significativas no núcleo flavonóide.

Figura 21. Estrutura química da rutina succinil

Figura 22. Estrutura química da rutina faloil

Figura 23. Estrutura química da rutina fenil-glutaroil

A reação química dos derivados deve ser conduzida a uma temperatura não superior a 70 °C, pois pode haver uma mudança de coloração dos compostos sintetizados de amarelo para marrom devido a uma possível oxidação dos grupamentos glicosídicos da molécula de rutina e também poderia ocorrer a hidrólise do éster formado. Possivelmente a oxidação da rutina acarretaria mudanças em suas propriedades antioxidantes, diminuindo sua eficácia.

Após sintetizados, a rutina succinil, a faloil e a fenil-glutaroil são bastantes higroscópicas, portanto o tempo entre a retirada do solvente do meio reacional até a

estocagem dos compostos em dessecadores (ambiente anidro) deve ser muito curto, para evitar a sua hidratação.

Utilizando o butanol ou o éter e lavando com hexano, a purificação após a reação não foi completa e tão eficaz. Por isso foi decidido realizar a sua purificação utilizando-se papéis cromatográficos, sendo feita uma pré-análise em placas de cromatografia delgada, suporte de sílica gel, obtendo-se os valores de R_f (Tabela 2), e após isto variando a proporção dos solventes da fase móvel, para a rutina succinil usou-se acetato de etila/acetona/ácido fórmico/água 20:2:1:1 (v/v/v/v) e para a rutina ftaloil e rutina fenil-glutaroil a proporção foi de 30:1:1:1 (v/v/v/v). Esta mudança na proporção dos solventes foi feita em função da observação de que aumentando a quantidade de acetato de etila para os derivados onde os grupos carboxilatos são cíclicos e aromáticos a separação das frações foram bem mais definidas. Foram realizadas 3 purificações para a retirada do excesso dos anidridos e solventes que poderiam interferir em outros ensaios.

Tabela 2 - Resultados dos valores de R_f da rutina e seus derivados hidrossolúveis (ensaio realizado em placas cromatográficas)

Substâncias	Fase móvel	Valor de R_f
Rutina	A	0,4
	B	0,2
Rutina succinil	A	0,5
	B	0,4
Rutina ftaloil	A	0,6
	B	0,4
Rutina fenil-glutaroil	A	0,8
	B	0,7

(A) acetato de etila/acetona/ácido fórmico/água na proporção 20:2:1:1 (v/v/v/v)

(B) acetato de etila/acetona/ácido fórmico/água na proporção 30:1:1:1 (v/v/v/v)

Após a separação por papel cromatográfico foi feita a determinação estrutural pela espectroscopia de ressonância magnética (RMN ^1H). No espectro de RMN ^1H da rutina succinil (Figura 39 do Anexo B) apareceu sinal com deslocamento químico (δ 2,33) referente ao grupamento CH_2 do anidrido succínico e no espectro da rutina fenil-glutaroil (Figura 41 do Anexo B) observou-se sinais em deslocamento do grupamento (δ 2,49) CH_2 e (δ 8,27) fenil, representando a adição dos respectivos anidridos aos grupamentos glicosídicos da rutina. Já na rutina ftaloil (Figura 40 do Anexo B) não aparece o sinal na região de CH_2 e sim em (δ 7,33 a δ 7,58) referentes ao anel aromático do anidrido ftálico. Estes resultados foram confirmados pela análise espectrofotométrica pela região do infravermelho, onde todos os espectros dos derivados relacionados com o espectro da rutina tiveram uma diminuição em sua absorção entre 3.300 a 3500 cm^{-1} , significando que os grupamentos das hidroxilas livres reagiram com os devidos anidridos. Além disso, no espectro da rutina succinil (Figura 35 do Anexo B) foi observado uma forte absorção em 2600 a 2900 cm^{-1} significando a ligação do grupamento CH_2 . Já no espectro da rutina fenil-glutaroil (Figura 37 do Anexo B) foi observado que esta absorção não foi tão forte, pela presença do grupamento fenil que também absorve nesta região. E na rutina ftaloil (Figura 36 do Anexo B), há a presença de um pico médio de absorção entre 2800 a 2900 cm^{-1} significando a presença do anel aromático do anidrido ftálico além do próprio núcleo flavonóide.

2.1.1 Separação e identificação das amostras pela eletroforese capilar

O principal objetivo do estudo realizado pelo método da eletroforese capilar foi em avaliar a síntese dos derivados hidrossolúveis pela diferença de tempo de migração e a eficiência da purificação das amostras por papel cromatográfico através dos picos observados no eletroferograma.

Nos eletroferogramas foram observados a mili-absorbância (mAU) em função do tempo de migração (min), além dos diversos picos da rutina e seus derivados analisados antes e depois de purificadas as amostras através de papéis cromatográficos, e verificação das regiões de absorção no UV.

Estes eletroferogramas estão representados na (a) Figura 24 (padrão de rutina): que é um parâmetro para verificação do tempo de separação da rutina de partida, (b) Figura 25 (derivado rutina succinil), (c) Figura 26 (derivado rutina ftaloil) e (d) Figura 27 (derivado rutina fenil-glutaroil). Nestas representações dos derivados são mostrados os vários picos de separações das purificações realizadas.

Nos eletroferogramas das Figuras 25 (A, B, C e D), 26 (E, F, G e H) e 27 (I, J, K, L) detectou-se a presença de vários picos em tempos de separações diferentes, os quais se referem aos vários graus de substituição nas hidroxilas da parte glicosídica da molécula de rutina que possam ter ocorrido durante sua síntese. Com a utilização do detector espectrofotométrico de absorção no UV/Vis, foi observado que todos os picos apresentam a mesma absorção na região de 257nm e próximo de 392nm, absorção máxima do núcleo flavonóide da rutina, confirmando a sua presença sem ter ocorrido a substituição.

Figura 24. Eletroferograma do padrão de rutina

Figura 25. Eletroferograma da rutina succinil (A) sem purificação (B) 1ª purificação (C) 2ª purificação (D) 3ª purificação.

Figura 26. Eletroferograma da rutina fialoil (E) sem purificação (F) 1ª purificação (G) 2ª purificação (H) 3ª purificação.

Figura 27. Eletroferograma da rutina fenil-glutaroil (I) sem purificação (J) 1ª purificação (K) 2ª purificação (L) 3ª purificação

2.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS DERIVADOS HIDROSSOLÚVEIS DA RUTINA

2.2.1 Determinação da solubilidade

A solubilidade é uma propriedade físico-química muito importante para se determinar a forma farmacêutica e cosmética adequada. A escolha dos solventes para o teste de solubilidade foi feita com relação à ordem decrescente de polaridade e aos seus valores de constantes dielétricas, pois quanto maior o valor desta constante maior a capacidade do solvente em solvatar cargas opostas de dois compostos. Na Tabela 3 consta a constante dielétrica de alguns solventes utilizados neste experimento.

A ordem decrescente de polaridade dos solventes estão relacionados abaixo:

água > ácidos orgânicos (ácido acético) > amidas (N,N-dimetil formamida) > álcoois (metanol, etanol) > aminas (triethylamina, piridina) > aldeídos, cetonas (acetona) > ésteres (acetato de etila) > haletos (clorofórmio, tetracloreto de carbono) > éteres (éter dietílico) > aromáticos (benzeno, tolueno) > alcanos (hexano, éter petróleo).

Tabela 3 - Constantes dielétricas de alguns solventes utilizados no experimento de solubilidade

Solventes	Constantes dielétricas (ϵ a 25 °C)
Hexano	1,9
Acetato de etila	6,0
DMF	37
Água	79
Éter dietílico	4,3
Álcool etílico absoluto	25
Metanol	32,6
Tolueno	2,4
Acetonitrila	38

Fonte: BRUICE, 2004

Comparando-se a solubilidade da rutina com a de seus derivados, observou-se que todos apresentaram uma solubilidade em água muito maior que a rutina. A rutina é solúvel em água numa proporção de 0,125 g/L, enquanto que as proporções da rutina succinil é de 800g/L, a rutina ftaloil é de 10,56g/L e a rutina fenil-glutaroil é de 0,69g/L havendo um aumento de 800, 85 e 5,5 vezes, respectivamente. A rutina ftaloil e a rutina fenil-glutaroil se mostraram solúveis em água, porém não na mesma proporção que a rutina succinil devido ao fato de que os grupamentos substituintes dos anidridos correspondentes possuem em sua molécula além dos carboxilatos, também o anel aromático, fazendo com que haja uma tendência menor pelo meio aquoso. Após as modificações químicas, a rutina tornou-se insolúvel em solventes orgânicos apolares, os quais possuem constantes dielétricas baixas, devido ao aumento dos grupamentos carboxilatos em sua molécula (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação da solubilidade da rutina em relação aos seus derivados hidrossolúveis

Substâncias Ensaçadas				
Solventes	Rutina	Rutina Succinil	Rutina Ftaloil	Rutina Fenil-glutaroil
Hexano	±	—	—	—
Acetato de etila	+	±	±	±
DMF	+	+	+	+
Piridina	+	+	+	+
Clorofórmio	±	—	—	—
Água	±	+	+	±
Éter	±	—	—	—
Álcool etílico absoluto	±	±	+	+
Metanol	+	±	±	±
Tolueno	±	—	—	—
Óleo de oliva	+	—	—	—
Glicerina	+	—	—	±
Metoxi-polietilenoglicol	+	—	—	+
Acetonitrila	—	±	±	—

(+) solúvel, (±) parcialmente solúvel, (—) insolúvel

2.2.2 Determinação do coeficiente de extinção molar

A análise espectrofotométrica foi realizada para verificar o perfil de absorção de UV de cada molécula sintetizada, através da varredura espectrofotométrica de 200 a 400nm.

Tabela 5 – Picos de absorção de UV da rutina e de seus derivados

Composto	Picos de absorção de UV
Rutina	268nm e 361nm (DMF)
Rutina succinil	271nm e 352nm (água)
Rutina ftaloil	271nm e 352nm (água)
Rutina fenil-glutaroil	265nm e 364nm (DMF:álcool:água, 3:2:1)

O coeficiente de extinção molar (ϵ) na equação de Lambert-Beer é a medida da intensidade de absorção de luz de um composto em solução num determinado comprimento de onda (PACE *et al.*, 1995).

A equação de Lambert-Beer está representada abaixo:

$A = \epsilon \cdot l \cdot C$, onde ϵ é o coeficiente de extinção molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l é o comprimento do caminho da luz que atravessa a cubeta (cm), A é a absorbância e C é a concentração da amostra (M).

O coeficiente de extinção molar (ϵ) na equação de Lambert-Beer é a medida da intensidade de absorção de luz de um composto em solução num determinado comprimento de onda. Quanto maior este valor mais fortemente o composto absorve luz no seu pico máximo de absorção (PACE *et al.*, 1995).

Os valores de coeficiente de extinção molar estão apresentados na Tabela 7, e os gráficos para o cálculo deste valor para a rutina, rutina succinil, rutina ftaloil e rutina fenil-glutaroil estão nos gráficos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Gráfico 1. Dependência entre a concentração de rutina e a absorbância. Rutina: $y = 0,03687x + 0,03912$. $r = 0,99549$. * Concentração $\times 10^{-6}$ M.

Gráfico 2. Dependência entre a concentração de rutina succinil e a absorbância. Rutina succinil: $y = 0,01223x + 0,01042$. $r = 0,99988$. * Concentração $\times 10^{-6}$ M.

Gráfico 3. Dependência entre a concentração de rutina ftaloil e a absorbância. Rutina ftaloil: $y = 0,0144x + 0,10964$. $r = 0,97824$. * Concentração $\times 10^{-6}$ M.

Gráfico 4. Dependência entre a concentração de rutina fenil-glutaroil e a absorbância. Rutina fenil-glutaroil: $y = 0,01594x + 0,08391$. $r = 0,98229$. * Concentração $\times 10^{-6}$ M.

Tabela 6 – Valores de concentração e absorção das amostras* para o cálculo do coeficiente de extinção molar. * Rutina (A), Rutina succinil (B), Rutina ftaloil (C) e Rutina fenil-glutaroil (D).

A	
Concentração (M)	Absorbância (A)
$0,67 \times 10^{-6}$	0,037
$1,67 \times 10^{-6}$	0,088
$2,66 \times 10^{-6}$	0,128
$3,33 \times 10^{-6}$	0,178
$13,30 \times 10^{-6}$	0,594
$26,60 \times 10^{-6}$	0,988

B	
Concentração (M)	Absorbância (A)
$8,18 \times 10^{-6}$	0,102
$16,35 \times 10^{-6}$	0,211
$32,70 \times 10^{-6}$	0,419
$65,4 \times 10^{-6}$	0,815
$98,10 \times 10^{-6}$	1,205

C	
Concentração (M)	Absorbância (A)
$12,17 \times 10^{-6}$	0,197
$17,03 \times 10^{-6}$	0,372
$24,33 \times 10^{-6}$	0,576
$48,65 \times 10^{-6}$	0,759
$72,98 \times 10^{-6}$	1,167

D	
Concentração (M)	Absorbância (A)
$3,04 \times 10^{-6}$	0,101
$6,08 \times 10^{-6}$	0,161
$9,12 \times 10^{-6}$	0,173
$15,19 \times 10^{-6}$	0,385
$30,38 \times 10^{-6}$	0,695
$48,60 \times 10^{-6}$	0,797
$60,75 \times 10^{-6}$	1,035

Tabela 7 – Valores do coeficiente de extinção molar da rutina e de seus derivados

Composto	$\lambda_{\text{máx}}$	$(\epsilon) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Rutina	361nm (DMF)	3.687
Rutina succinil	352nm (água)	1.223
Rutina flaloil	352nm (água)	1.440
Rutina fenil-glutaroil	364nm (DMF:álcool:água, 3:2:1)	1.594

Comparando os picos de absorção de UV da rutina com os de seus derivados, verificou-se um deslocamento de seus picos de mínimo e máximo o que indicou a presença de substituintes na estrutura dos grupos glicosídicos da molécula de rutina ou uma mudança química ocorrida no núcleo flavonóide.

O valor do coeficiente molar da rutina foi maior com relação aos seus derivados, possivelmente por ter ocorrido uma alteração discreta no núcleo flavonóide ou mesmo interação destas moléculas com o solvente, o qual este núcleo é o responsável pela absorção da luz da rutina.

2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* PELO TESTE DO ÁCIDO 2-TIOBARBITÚRICO (TBA)

Os valores de IC_{50} foram calculados utilizando-se um modelo de equação polinomial estatístico específico de **dose** (concentração de antioxidantes – μM) em função da **resposta** (atividade antioxidante - %). Os gráficos 5, 6 e 7 representam este modelo descrito anteriormente para cada um dos antioxidantes: α -tocoferol, rutina e rutina succinil, respectivamente, utilizando o α -tocoferol como padrão no teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Na Tabela 8 são observados os dados dos gráficos 5, 6 e 7.

Gráfico 5. Atividade antioxidante do α -tocoferol através do método de lipoperoxidação espontânea em homogenato de cérebro *in vitro* pelo teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)

Gráfico 6. Atividade antioxidante da rutina através do método de lipoperoxidação espontânea em homogenato de cérebro *in vitro* pelo teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)

Gráfico 7. Atividade antioxidante da rutina succinil através do método de lipoperoxidação espontânea em homogenato de cérebro *in vitro* pelo teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)

Tabela 11 - Valores da concentração do antioxidante[&] e da atividade antioxidante (%), através do método de lipoperoxidação espontânea. [&] α-tocoferol (A), Rutina (B) e Rutina Succinil (C)

A		
μg/mL*	μM*	AA (%) ¹
49,18	114,18	54,88
32,78	76,12	46,14
24,59	57,09	40,33
16	38	31,55
8,19	19,01	28,87
3,28	7,61	13,14
1,63	3,8	4,21

B

$\mu\text{g/mL}^*$	μM^*	AA (%) ¹
40,98	67,12	97,31
32,78	53,69	98,33
24,59	40,27	94,80
16,39	26,84	85,39
8,19	13,41	51,34
4,09	6,71	26,50
1,64	2,68	5,02

C

$\mu\text{g/mL}^*$	μM^*	AA (%) ¹
49,18	40,62	81,31
40,98	33,85	70,81
32,78	27,08	65,35
24,59	20,31	53,81
16,39	13,54	35,75
8,19	6,77	14,39
4,91	4,06	4,64

* Este é o valor da concentração no meio reacional

¹ AA = Atividade Antioxidante (%)

Na Tabela 12 estão sendo mostrados os valores de IC₅₀ para cada substância indicando a concentração em μM necessária para inibir 50% da formação de autoxidação do homogenato de cérebro.

Tabela 12 - Valores de IC₅₀ do α -tocoferol, da rutina e da rutina succinil

Substância	IC ₅₀	n	Desvio Padrão
α -tocoferol	104,50	2	16,22
Rutina	13,46	2	0,03
Rutina succinil	25,27	2	3,44

n – foram traçadas 2 curvas para cada substância para ser calculado o IC₅₀

Desvio Padrão – em relação a rutina.

Variável IC₅₀ em uma análise de variância “one way” (ANOVA): $\alpha = 0,05\%$ com testes de Tukey HSD (*Honest Significant Difference*) para identificação dos contrastes significativos.

A lipoperoxidação de membranas é habitualmente monitorada pelo método do MDA (malondialdeído), um dos mais utilizados para aferição indireta das espécies reativas do oxigênio e, conseqüentemente, das lesões oxidativas por espectrofotometria, medindo a concentração de aldeídos formados (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Sabe-se que as espécies reativas do oxigênio podem ser a causa ou a conseqüência de doenças humanas associadas ao estresse oxidativo. Por isso, antioxidantes naturais e sintéticos têm sido recomendados para o alívio dos sinais e sintomas destas doenças e também para bloquear sua evolução. No entanto devem ser feitas muitas pesquisas a respeito do benefício dos antioxidantes exógenos, determinando o momento exato, a dose, a via de administração e qual o antioxidante ideal para cada doença.

Em relação à atividade antioxidante pelo método do ácido tiobarbitúrico, os valores de IC_{50} para o α -tocoferol, rutina e rutina succinil foram 104,5 μ M, 13,46 μ M e 25,24 μ M, respectivamente, conforme mostrado na Tabela 12. O valor de IC_{50} indica a concentração necessária para inibir 50% de autoxidação do homogenato de cérebro e quanto menor for este valor maior será a atividade antioxidante da amostra testada.

Fazendo uma análise estatística desses valores, pode-se concluir que os valores de desvio padrão de IC_{50} para a rutina e rutina succinil são pequenos e não são significativamente diferentes, isto quer dizer que apesar da modificação química realizada na molécula da rutina, os grupamentos das hidroxilas presentes no núcleo flavonóide não ficaram impedidos de inibir a peroxidação lipídica.

O resultado da rutina foi comparado com o da literatura, em estudos realizados por Brivida e Sies (1994), em homogenato microsomal de ratos, onde o valor de IC_{50} para a rutina foi de 14 μ M, portanto o nosso valor de 13,46 μ M mostrou-se bastante próximo e coerente, fazendo com que os resultados obtidos neste experimento tivessem fundamento.

Além disso, comparando-se os resultados da rutina e rutina succinil com o do α -tocoferol (14,4 μ M) encontrado na literatura e ensaiado no mesmo modelo experimental, indicam uma importante atividade antioxidante destes flavonóis quando comparados com o padrão (BARROS *et al.*, 1996).

Em comparações *in vitro* do α -tocoferol com outros fenóis sintéticos ou naturais, ele têm mostrado que tem uma atividade antioxidante moderada, porém é muito ativo e interfere em um ou mais passos de propagação do processo de peroxidação lipídica, e também possui uma estrutura bastante promissora para uma alta atividade de seqüestro de radicais livres (ACKER; KOYMANS; BAST, 1993).

Esta atividade moderada mostrada pelo α -tocoferol, pode ser justificada pelo fato de que em experimentos de processos de auto-oxidação, estes são iniciados por quantidades variadas de impurezas (peróxidos, íons de metais de transição), interferindo bastante no processo normal de lipoperoxidação, podendo estar inibindo a ação total do α -tocoferol. Pode ter sido uma das causas de interferência para o resultado muito alto de IC₅₀ do α -tocoferol (104,5 μ M) nas condições ensaiadas neste experimento.

Já num processo de auto-oxidação controlável, que é o caso de experimentos de seqüestro de radicais, isto depende da reatividade do fenol junto com radicais peroxilas e do número de radicais que podem ser seqüestrados por fenol (η), havendo um melhor controle de interferentes no sistema (ACKER; KOYMANS; BAST, 1993; IWATSUKI *et al.*, 1994).

Em estudos realizados com o α -tocoferol como seqüestrador de radicais livres, este se mostrou mais eficiente em meio lipídico utilizando o azo-iniciador de radicais livres 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitrila) (AMVN), mas com menor eficiência em meio aquoso, utilizando o azo-iniciador dihidrocloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH) (ACKER; KOYMANS; BAST, 1993).

2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE SEQÜESTRO DE RADICAIS LIVRES POR MEDIÇÃO QUIMILUMINESCENTE DO SISTEMA AAPH-LUMINOL

Nos testes de determinação da atividade anti-radical pelo sistema AAPH-luminol, o Trolox tem sido usado como composto de referência por causa de sua estabilidade por muitas horas em solução a temperatura ambiente e sua adição em sistema de luminol resulta em quase completa supressão da luz de emissão, a qual é restabelecida imediatamente após o seu consumo total. Além disso, é um inibidor que remove 2 radicais por molécula de radical acrescentada (LISSI *et al.*, 1992; ROMAY *et al.*, 1996)

A estrutura do Trolox (Figura 28) apresenta os requisitos para uma ação antioxidante efetiva: um fenol impedido com um oxigênio de éter em posição *para* em um sistema de anel cuja estrutura proporciona estabilização estereoeletrônica do radical fenoxil resultante, na transferência do átomo de hidrogênio a um radical de oxigênio, como o peroxil. Devido a esta estrutura de cromanol, que proporciona a característica antioxidante e o grupo carboxílico, que confere moderada solubilidade em meio aquoso, o Trolox apresenta vantagens em relação a outros antioxidantes.

Figura 28. Estrutura química do Trolox (ácido 6-hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-óico).

O experimento foi realizado em pH 9,0, a 37 °C, sendo esta uma faixa de pH ideal para a estabilidade do tampão TRIS. Além disso, a luminescência nestas condições apresentou-se entre 25.000 a 35.000 RLU, sendo estes resultados bastantes reprodutíveis. Em experimentos conduzidos a temperatura de 30 °C a faixa de emissão de luz variou de 2.500 – 3.000 RLU, pois a geração de radicais livres está associada a variáveis de pH e temperatura, pois quanto

maior a temperatura e o pH maior será a geração de radicais peroxilas (KRASOWSKA, *et al.*, 2000).

O sistema luminol-AAPH pode ser usado para testar vários antioxidantes e gera luminescência forte e prolongada. Neste sistema em particular, a intensidade luminescente rapidamente sobe a um valor máximo e então se mantém quase constante por alguns minutos. Ele permite avaliar não somente os produtos finais da reação dos constituintes celulares com os radicais livres, mas também a observação da reação de cinética (KRASOWSKA *et al.*, 2000).

Em pH 9, a maioria das moléculas de Trolox encontram-se ionizadas devido à dissociação dos grupos carboxilas. A termólise do composto AAPH gera 2 radicais peroxilas carregadas positivamente, com isto a reação entre os grupos hidroxilas do Trolox e os radicais livres derivados do AAPH é facilitada (ROMAY *et al.*, 1996).

Os valores da cinética de emissão de luz obtido no sistema AAPH/luminol após a adição de diferentes concentrações de Trolox, rutina, rutina succinil, rutina ftaloil e rutina fenil-glutaroil, estão apresentados nos gráficos 8, 10, 12, 14 e 16, respectivamente, acompanhados de suas tabelas de concentrações de antioxidantes em função da área suprimida.

Gráfico 8. Efeito da adição de diversas concentrações de Trolox, 11 minutos após o início da reação, sobre a cinética de emissão. RLU – Unidades Relativas de Emissão de Luz. [luminol]: 100µM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=5).

Gráfico 9. Dependência entre a concentração de Trolox e a área de supressão obtida. Trolox: $y = 4,26914x + 0,20808$, $r = 0,96482$. *Área $\times 10^6$ (RLU). [luminol]: 100µM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=5).

Gráfico 10. Efeito da adição de diversas concentrações de rutina, 11 minutos após o início da reação, sobre a cinética de emissão. RLU – Unidades Relativas de Emissão de Luz. [luminol]: 100µM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=5).

Gráfico 11. Dependência entre a concentração de rutina e a área de supressão obtida. Rutina: $y = 6,93702x + 0,61985$, $r = 0,98771$. *Área $\times 10^6$ (RLU). [luminol]: 100µM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=5).

Gráfico 12. Efeito da adição de diversas concentrações de rutina succinil, 11 minutos após o início da reação, sobre a cinética de emissão. RLU – Unidades Relativas de Emissão de Luz. [luminol]: 100µM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=5).

Gráfico 13. Dependência entre a concentração de rutina succinil e a área de supressão obtida. Rutina Succinil: $y = 4,3177x - 0,40729$, $r = 0,96824$. *Área x 106 (RLU). [luminol]: 100µM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=5).

Gráfico 14. Efeito da adição de diversas concentrações de rutina ftaloil, 11 minutos após o início da reação, sobre a cinética de emissão. RLU – Unidades Relativas de Emissão de Luz. [luminol]: 100µM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=10).

Gráfico 15. Dependência entre a concentração de rutina ftaloil e a área de supressão obtida. Rutina Ftaloil: $y = 17,69038x + 0,41291$, $r = 0,98367$. *Área $\times 10^6$ (RLU). [luminol]: 100µM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=10).

Gráfico 16. Efeito da adição de diversas concentrações de rutina fenil-glutaroil, 11 minutos após o início da reação, sobre a cinética de emissão. RLU – Unidades Relativas de Emissão de Luz. [luminol]: 100µM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=7).

Gráfico 17. Dependência entre a concentração de rutina fenil-glutaroil e a área de supressão obtida. Rutina fenil-glutaroil: $y = 1,9352x + 0,98024$, $r = 0,96386$. *Área $\times 10^6$ (RLU). [luminol]: 100µM; [AAPH]: 4mM, em tampão TRIS 0,1M pH 9,0 (n=7).

Tabela 13 - Valores da concentração do antioxidante* e da área suprimida (RLU), através do método de seqüestramento de radicais livres usando o sistema AAPH/luminol. *Trolox (A), Rutina (B), Rutina Succinil (C), Rutina Ftaloil (D), Rutina Fenil-glutaroil (E). n = número de amostras

A		
Concentração (μM)	Área suprimida	n
0,2	7.277.902	5
0,4	20.141.074	5
0,6	32.902.380	5
1,0	41.922.878	5

B		
Concentração (μM)	Área suprimida	n
0,05	9.089.859	5
0,09	11.713.735	5
0,15	17.511.366	5
0,20	19.661.901	5

C		
Concentração (μM)	Área suprimida	n
0,32	10.429.971	5
0,40	13.394.149	5
0,48	14.723.854	5
0,60	22.879.101	5

D		
Concentração (μM)	Área suprimida	n
0,05	12.793.005	10
0,08	17.113.842	10
0,10	22.997.553	10
0,12	26.723.000	10
0,15	29.470.187	10

E		
Concentração (μM)	Área suprimida	n
0,6	1.323.992	7
0,8	2.867.174	7
1,0	3.196.413	7
2,0	5.428.918	7
3,2	6.792.203	7

Tabela 14 - Número de radicais seqüestrados (η) por uma molécula inibidora, obtida pelo método AAPH/luminol

Substância	η
Trolox	2
Rutina	3,25
Rutina succinil	2,01
Rutina ftaloil	8,28
Rutina fenil-glutaroil	0,91

As atividades anti-radicaís da rutina e da rutina ftaloil apresentaram-se 1,6 e 4,1 vezes maiores, respectivamente, que o Trolox nas mesmas condições. Já os resultados da rutina succinil e rutina fenil-glutaroil apresentaram-se como a mesma atividade e 0,46 menor, respectivamente, que o Trolox nas mesmas condições. Estes valores dos flavonóis foram comparados com o valor de Trolox ($\eta = 2$), conforme Tabela 14 (WAYNER, *et al.*, 1985; ROMAY *et al.*, 1996). Os resultados dos derivados hidrossolúveis da rutina foram favoráveis em pH 9,0, provavelmente devido aos grupamentos carboxilatos, tornando-se totalmente solúveis, fazendo com que as hidroxilas do anel flavonóide ficassem ativas para agir contra os radicais peroxilas gerados.

O resultado da rutina foi comparado com o da literatura, em estudos realizados por Lien *et al.* (1999), em meio hidrossolúvel, o valor de η para a rutina foi de 2,40 e o valor observado em nosso experimento está próximo e coerente ($\eta = 3,25$).

Entre os derivados o resultado que se mostrou melhor foi o da rutina ftaloil, pois além de solubilizá-la no meio reacional, o anel aromático do anidrido ftálico poderia ter atuado em sinergia com o núcleo flavonóide como seqüestrador de radical livre. Com relação ao resultado baixo da capacidade de seqüestrar radical livre da rutina fenil-glutaroil, pode ser devido a um impedimento do núcleo do anel flavonóide, pois neste caso o grupamento fenil não possui hidroxilas livres ligadas a ele para estabilizá-lo. Esta falta de grupamentos de estabilização presentes nos carboxilatos também pode ter sido a causa para que a atividade anti-radical da rutina succinil não fosse maior que a do Trolox.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes

- Rutina - Natural Pharma com teor de 98,8%;
- Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), α -tocoferol (ácido 6-hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-óico), ácido tricloroacético (TCA) foram de procedência Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA);
- Cloreto de sódio, fosfato monossódico (NaH_2PO_4) e fosfato dissódico (Na_2HPO_4) foram de procedência p.a. Merck;
- TRIS [hidroximetil]aminometano de procedência Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA);
- Anidrido ftálico, anidrido succínico, anidrido 2-fenilglutárico foram de procedência Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA);
- Solventes orgânicos: álcool etílico absoluto, metanol, hexano, acetato de etila, DMF (N,N-dimetil formamida), piridina, clorofórmio, éter dietílico, tolueno, glicerina, metoxi-poli(etilenoglicol), acetonitrila. Todos estes reagentes foram de grau técnico;
- AAPH (dihidrocloridrato de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano), luminol (5-amino-2,3-dihidro-ftatazina-1,4-diona), Trolox (derivado hidrossolúvel do α -tocoferol) foram de procedência Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA);
- Cromatofolhas de alumínio (sílica gel TCL 20 x 20cm, 60 F₂₅₄ da Merck);
- Papéis cromatográficos (PC Whatman 3MM 57 x 46 cm).

3.1.2 Equipamentos

- Liofilizador Microprocessado da FTS Systems, com central de controle, bomba de vácuo de dois estágios, extrator de amostras, analisador de umidade, sistema de fechamento de amostras eletro-mecânico, operando sob fluxo laminar;
- Centrífuga refrigerada Hitachi CR20-B2;
- Espectrofotômetro Incibrás MF-200;
- Homogeneizadores Ultra Turax;
- Agitador Orbital Newbrunswick MG76;
- Agitador manual e mecânico;
- Estufa para secagem e esterização MA033 Marconi;
- Balança Analítica Precisa 205A SCS;
- Balança Semi-analítica Marte LC1;
- Bomba de vácuo;
- Freezer, KELVINATOR, Series 100;
- Evaporador rotativo 802A - Fisatom;
- Equipamento de eletroforese capilar (modelo HP3DCE, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipado com fonte de alta tensão (0-30 kV), com um detector *diode array*;
- Luminômetro microplacas – EG&G Berthold LB96V;
- Espectrofotômetro – Spectronic Instruments, Genesys 5.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Síntese química dos derivados hidrossolúveis da rutina

Esta parte experimental do projeto de pesquisa foi realizado no laboratório de Síntese Orgânica Aplicada do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, que contou com espaço físico adequado e os equipamentos necessários para a realização deste estudo.

3.2.1.1 Síntese química da rutina succinil

Uma solução de rutina (5g, 8,2mmol), anidrido succínico (7,5g, 74,94mmol) em piridina (200mL) foi aquecida a uma temperatura de 70 °C por 24 horas. Depois de removida a piridina por rotaevaporação, foi adicionado butanol (20mL) a quente e solubilizada. Esta solução foi previamente resfriada e acrescentada de éter (20mL) a frio, filtrada a vácuo e lavada com éter (2 x 20mL). Após isto foi solubilizada em água e liofilizada. A síntese química da rutina succinil é mostrada na Figura 29 (ALLUIS *et. al.*, 2000).

Figura 29. Esquema da síntese química da rutina succinil

3.2.1.2 Síntese química da rutina ftaloil

Uma solução de rutina (5g, 8,2mmol), anidrido ftálico (10,91g, 73,66mmol) em piridina (200mL) foi aquecida a uma temperatura de 70 °C por 24 horas. Depois de removida a piridina por rotaevaporação, foi adicionado butanol (20mL) a quente e solubilizada. Esta solução foi previamente resfriada e acrescentada butanol (20mL) a frio, filtrada a vácuo e lavada com hexano (2 x 20mL) Após isto foi solubilizada em água e liofilizada. A síntese química da rutina ftaloil é mostrada na Figura 30.

Figura 30. Esquema da síntese química da rutina ftaloil

3.2.1.3 Síntese química rutina fenil-glutaroil

Uma solução de rutina (0,08747g, 0,14mmol), anidrido fenil-glutárico (0,2451g, 1,28mmol) em piridina (3,5mL) foi aquecida a temperatura de 70 °C por 24 horas. Depois de removida a piridina por rotaevaporação, foi adicionado butanol (20mL) a quente e a amostra solubilizada. Esta solução foi previamente resfriada e acrescentada de butanol (20mL) a frio,

filtrada a vácuo e lavada com hexano (2 x 20mL) Após isto foi solubilizada em água e liofilizada. A síntese química da rutina fenil-glutaroil é mostrada na Figura 31.

Figura 31. Esquema da síntese química da rutina fenil-glutaroil.

3.2.2 Purificação dos derivados sintetizados

A purificação dos derivados da rutina por papel cromatográfico foi feita no laboratório de Fitoquímica e Sistemática Molecular do Departamento de Botânica (IBUSP). E depois a sua análise por eletroforese capilar foi realizada no laboratório de Cromatografia de Eletroforese Capilar (LACE) do Departamento de Química Analítica (IQUSP).

3.2.2.1 Cromatografia de camada delgada e purificação das amostras em papéis cromatográficos

Neste método de cromatografia de camada delgada uma análise que deve ser realizada criteriosamente é a escolha de um sistema de eluentes ideais com o principal objetivo de separar e identificar grupos específicos de compostos (MEDIĆ *et al.*, 2004).

As amostras (concentração de 0,1mg/mL) de rutina e de seus derivados foram solubilizadas em solução de etanol a 80% (Figura 32), seguido do preparo de 2 fases móveis diferentes (Tabela 15) selecionadas de acordo com suas polaridades e identificadas em cromatofolhas de alumínio.

Figura 32. Soluções de etanol a 80% das seguintes amostras: (I) rutina, (II) rutina succinil, (III) rutina ftaloil e (IV) rutina fenil-glutaroil

Tabela 15. Sistema de cromatografia de camada delgada estudado

Sistema cromatográfico	Solvente (v/v/v/v)
A	acetato de etila:acetona:ácido fórmico:água, 20:2:1:1
B	acetato de etila:acetona:ácido fórmico:água, 30:1:1:1

As placas cromatográficas secas foram visualizadas com vapores de amônia e interpretadas sob luz UV (366nm). Por este método foi obtido o R_f das amostras, conforme mostrado na Figura 33 e explicado a legenda na Tabela 16.

Tabela 16. Legenda das amostras da Figura 32

Fase móvel - acetato de etila:acetona:ácido fórmico:água, 20:2:1:1 (v/v/v/v)

(a1) rutina, (a2) rutina succinil
 (b1) rutina (b2) rutina ftaloil
 (c1) rutina (c2) rutina fenil-glutaroil

Fase móvel - acetato de etila:acetona:ácido fórmico:água, 30:1:1:1 (v/v/v/v)

(d1) rutina (d2) rutina succinil
 (e1) rutina (e2) rutina ftaloil
 (f1) rutina (f2) rutina fenil-glutaroil

Figura 33. Interpretação das amostras em placas cromatográficas de camada delgada

A partir da análise das placas de cromatografia com relação à melhor separação entre as frações de origem e as frações migratórias, escolheu-se o sistema ideal de solventes da fase móvel para cada uma das amostras dos derivados sintetizados: rutina succinil (acetato de etila:acetona:ácido fórmico:água, 20:2:1:1) e rutina ftaloil e fenil-glutaroil (acetato de etila:acetona:ácido fórmico:água, 30:1:1:1).

As amostras dos derivados da rutina foram solubilizadas em solução de metanol e aplicadas como faixas saturadas em papéis cromatográficos. Em seguida em câmaras fechadas e saturadas com o sistema de solventes escolhidos previamente, fez-se a corrida por 12 horas, separando-se em duas frações (uma migratória e outra fixa na própria origem). A visualização foi feita com vapores de amônia e interpretadas sob luz UV (366nm).

O papel foi recortado em torno da faixa migratória e este foi colocado num tubo de ensaio contendo metanol quente para a extração das substâncias por rotaevaporação. A

substância purificada foi armazenada num frasco âmbar e este procedimento de purificação foi repetido por mais duas vezes.

3.2.2.2 Separação e identificação das amostras pela eletroforese capilar

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica aplicável na determinação de uma grande variedade de amostras, incluindo hidrocarbonetos aromáticos, vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis, aminoácidos, íons inorgânicos, ácidos orgânicos, fármacos, catecolaminas, substâncias quirais, proteínas, peptídeos, diferindo de outras técnicas pela sua capacidade única de separar macromoléculas carregadas eletricamente de interesse tanto em indústrias de biotecnologia quanto em pesquisas biológicas. Além de possuir vantagens em relação a sua rapidez, versatilidade, baixo custo por análise, alto poder de resolução, consumo mínimo de amostras, reagentes e solventes, possibilidade de automação e detecção *on-line* (FONSECA *et al.*, 2001).

Este método é definido como sendo a migração de espécies carregadas eletricamente, que ocorre quando as mesmas são dissolvidas ou suspensas em um eletrólito, através do qual uma corrente elétrica é aplicada (FONSECA *et al.*, 2001).

As condições para a realização do teste foram: tetraborato de sódio 20mM, capilar de 48,5cm, potência aplicado 25kV, injeção por pressão 2s, 30mBar e temperatura do capilar 25°C. O aparelho é equipado com fonte de alta tensão (0-30 kV), com um detector *diode array*, e o comprimento de onda utilizado foi 392 nm. As amostras foram solubilizadas em etanol.

3.2.3 Determinação da solubilidade

Os flavonóis glicosídicos são solúveis em água e álcoois, mas há algumas exceções que são parcialmente solúveis em água como a rutina e hesperidina (BRUNETON, 1999; HARBORNE, 1988).

Para a realização do ensaio de solubilidade das diversas amostras (concentração de 3mg) de rutina e dos seus derivados (divididas igualmente nas placas de petri) foram adicionados 300µL dos seguintes solventes: hexano, acetato de etila, N-N-dimetil formamida, piridina, clorofórmio, água, éter, álcool etílico absoluto, metanol, tolueno, óleo de oliva, glicerina, metoxi-poli-etilenoglicol e acetonitrila (KHALIFA; MUHTADI; HASSAN, 1983). Foi realizado a uma temperatura de 21 °C.

3.2.4 Ensaio de varredura espectrofotométrica e determinação do coeficiente de extinção molar (ϵ)

A análise espectrofotométrica foi realizada para verificar o perfil de absorção de UV de cada molécula sintetizada. As leituras das amostras foram realizadas no espectrofotômetro Spectronic Instruments, Genesys 5 no comprimento de onda de 200 a 400nm, como segue: rutina (10µg/mL, 16,37µM) em N-N dimetil formamida, rutina succinil (160µg/mL, 132,18µM) e rutina ftaloil (190µg/mL, 126,74µM) em água, e rutina fenil-glutaroil (110µg/mL, 62,80µM) em N-N dimetil formamida:álcool etílico absoluto:água na seguinte proporção 3:2:1 (v/v/v/v).

As leituras das concentrações das soluções das amostras, devidamente pesadas após o método do peso seco, foram realizadas no espectrofotômetro Spectronic Instruments, Genesys 5 como segue: rutina (3,25mg/mL, 5,32mM) em N-N dimetil formamida (361nm), rutina succinil (7,92mg/mL, 6,54mM) em água (352nm), rutina ftaloil (14,58mg/mL, 9,73mM) em

água (352nm) e rutina fenil-glutaroil (21,28mg/mL, 12,15mM) (364nm) em N-N dimetil formamida:álcool etílico absoluto:água na seguinte proporção 40:30:10 (v/v/v/v).

3.2.5 Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)

3.2.5.1 Tratamento dos animais

O procedimento referente ao tratamento dos animais é baseado no ensaio de avaliação da atividade antioxidante proposto por Stocks *et al.* (1974) e Lissi *et al.* (1986) – *Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids*.

Foram utilizados ratos machos Wistar Hannover (*Rattus norvegicus albinus*, Muridae), procedentes do biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos sob temperatura (22 ± 2 °C) e umidade ($55 \pm 10\%$) controladas, trocas de ar (15-20 trocas), fotoperíodo de 12 horas claro/escuro e padrão sanitário - SPF (livres de patógenos específicos). Receberam antes do estudo, ração comercial irradiada do laboratório Guabi Nutrilabor e água filtrada, ambos *ad libitum*. Permaneceram em jejum nas 12 horas que antecederam o início do experimento.

Os 28 animais, foram divididos em 4 grupos, os quais se referem ao grupo controle-padrão (6 animais), grupo controle (6 animais), grupo derivado hidrossolúvel 1 (6 animais) e grupo para testes preliminares para padronização do método (10 animais). Tinham a idade entre 8 a 12 semanas e peso médio de 200g.

O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas em 04/10/2004 (Protocolo nº 42), e está de

acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

De acordo com a metodologia adotada e com as atividades de rotina praticadas no Laboratório de Patologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, foram realizados os procedimentos que se seguem:

- Foi utilizado éter etílico como anestésico para o procedimento da eutanásia por aprofundamento da anestesia. Após o sacrifício destes animais e a abertura da cavidade peritoneal houve a perfusão do cérebro do rato através do ventrículo esquerdo do coração com solução tampão 140mM NaCl e 40 mM fosfato de sódio pH 7,4 (4 °C). Logo em seguida sendo feita a retirada do cérebro e a conseqüente preparação do homogenato.

3.2.5.2 Avaliação da lipoperoxidação

A peroxidação espontânea no homogenato de cérebro foi avaliada pela produção de malondialdeído (MDA). Esta técnica determina colorimetricamente o produto de reação entre o ácido tiobarbitúrico e o malondialdeído produzido durante a quebra de lipídeos peroxidados.

3.2.5.3 Obtenção do homogenato de cérebro de rato

Foi feita a retirada do cérebro e este foi homogeneizado em quatro vezes o seu peso de volume do tampão acima mencionado (1g : 4mL), em um homogeneizador Ultra Turax. O homogenato foi então centrifugado durante 15 minutos a 1000g a 4 °C. Após isto, o sobrenadante foi diluído e homogeneizado em três vezes o seu volume com o tampão acima mencionado (1mL + 3mL).

3.2.5.4 Medida da lipoperoxidação através da produção de malondialdeído

Essa medida foi feita adicionando-se em erlenmeyers 3mL do sobrenadante do homogenato diluído com 50μL das concentrações das soluções dos antioxidantes solubilizadas em etanol a 70% e o controle com apenas 3mL do homogenato diluído.

Em tubos plásticos foram acrescentados 1mL de ácido tricloroacético e 1mL da mistura do sobrenadante do homogenato com as concentrações do extrato. Estes foram chamados de tubos T₀ (tempo inicial – zero).

Os erlenmeyers foram incubados por 1 hora em banho de Dubnoff a 37 °C com velocidade 5. Após uma hora, foram transferidos 1mL do incubado para os outros tubos de plástico contendo TCA 5%. Estes tubos foram chamados de T_{1 hora} (tempo final – 1 hora).

Estas misturas foram centrifugadas durante 15 minutos a 3000 rpm. A quantidade de malondialdeído (MDA) produzido foi avaliada através da reação de 1mL do sobrenadante com 1mL de ácido tiobarbitúrico, sob aquecimento em banho de água fervente, depois banho de gelo e por fim temperatura ambiente, todos por 20 minutos.

A leitura foi feita em espectrofotômetro em 532nm.

3.2.5.5 Cálculo da concentração de antioxidante

Em relação às curvas obtidas do ensaio de MDA com diferentes concentrações das amostras, foi calculado o IC₅₀ indicando a concentração em μg/mL necessária para inibir 50% da formação de autoxidação do homogenato de cérebro, onde valores baixos de IC₅₀ correspondem a uma alta atividade antioxidante (STOCKS *et al.*, 1974; Lissi *et al.*, 1986).

$$\% \text{ da Concentração antioxidante} = 1 - \left[\frac{T_{1\text{hora}} \text{ do extrato} - T_0 \text{ do extrato}}{T_{1\text{hora}} \text{ do controle} - T_0 \text{ do controle}} \right] \times 100$$

3.2.6 Determinação da atividade de seqüestro de radicais livres por medição quimiluminescente do sistema AAPH-luminol

O ensaio anti-radical foi realizado no aparelho Luminômetro a 37 °C. Uma solução estoque de 0,25mM de luminol (5-amino-2,3-dihidro-ftalazina-1,4-diona) foi preparada em 0,1M – pH 10 de NaOH e estocada a 4 °C por 8 dias. A solução estoque de 40 mM de AAPH foi preparada em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4 (4 °C) e usada imediatamente. As soluções estoques dos anti-radicais utilizados foram preparadas em etanol a 80% e estocadas a 4 °C: Trolox (10mM), rutina (10mM), rutina succinil (2,25mM), rutina ftaloil (1,1mM), rutina fenil-glutaroil (0,71mM). Os experimentos foram feitos num volume final de 250µL em microplacas brancas numa solução tampão 0,1M de Tris pH 9,0 a uma temperatura de 37 °C, adicionadas 100µL de luminol, 25µL de AAPH e a solução de antioxidante foi injetada automaticamente após 11 minutos de iniciada a reação. A mistura reacional final continha 100µM de luminol e 4mM de AAPH.

Quantificação. A intensidade da emissão de luz varia com o tempo. Com isto foi calculada a área da curva de decaimento quimiluminescente da reação com o acréscimo do antioxidante até voltar a produzir a emissão de luz. Compostos que seqüestram radicais livres consomem espécies reativas e suprimem a emissão de luz.

O cálculo do tempo de supressão foi medido através da diferença entre os instantes da adição do antioxidante e do retorno de 50% da intensidade luminosa.

O cálculo da área de supressão foi feito através de uma curva cinética resultante da adição de um antioxidante (I em RLU/s *versus* tempo em segundos) e é subtraída uma linha reta que intercepta os instantes onde o antioxidante foi adicionado e o de retorno da intensidade luminosa ao sistema padrão. Com isso, obtém-se uma área de integração variando de 0 a –I, equivalente à diferença entre a integral da curva de decaimento padrão e a curva obtida com a adição de antioxidante.

O valor obtido em módulo da área representa a medida em RLU equivalente a radicais consumidos por todo o conteúdo antioxidante presente na amostra e é, então, comparado com o antioxidante padrão, Trolox, e reportado como a capacidade antioxidante da amostra, conforme a equação I (LISSI *et al.*, 1995; KRASOWSKA *et al.*, 2000; BASTOS *et al.*, 2003; ROMAY *et al.*, 1996).

$$n_s = \frac{\alpha_s}{\alpha_T} \times 2$$

n_s = número de seqüestro de radicais livres.

α_s = inclinação da reta (amostra)

α_T = inclinação da reta (padrão Trolox)

3.2.7 Determinação estrutural: espectroscopia de ressonância magnética nuclear e na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) e a ressonância magnética nuclear (RMN) são técnicas importantes na identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações químicas.

Foram confirmadas as estruturas químicas das amostras de rutina (61mg – metanol deuterado), rutina succinil (31,4mg – água deuterada), rutina ftaloil (24,7mg – água deuterada) e rutina fenil-glutaroil (31,3mg – DMSO deuterado) pela espectroscopia na região do infravermelho e pela ressonância magnética nuclear (RMN ^1H).

Espectroscopia de RMN ^1H : Aparelho Bruker 300MHz, deslocamento químico δ em ppm e constante de ligação J em Hz.

Espectroscopia na região do infravermelho: Aparelho Bomem MB 100, pastilhas de KBr, resolução de 4cm^{-1} , 21 *scans*/min, frequência de comprimento de onda ($400 - 4000\text{cm}^{-1}$) e transmitância (%).

3.2.8 Análise estatística

O tratamento estatístico dos grupos experimentais foi feito através de uma matriz de obtenção de dados por uma análise de variância “one way” (ANOVA): $\alpha = 0,05\%$ com testes de Tukey HSD (*Honest Significant Difference*) para identificação dos contrastes significativos.

Todos os dados foram analisados previamente quanto a normalidade e a homogeneidade das variâncias.

Os cálculos e gráficos foram elaborados utilizando-se o *software* Statistica v. 6.1.

A análise estatística do estudo de avaliação da atividade antioxidante do α -tocoferol, da rutina e de seu derivado hidrossolúvel em diferentes concentrações, foi feita em 4 grupos experimentais:

- **Grupo controle-padrão** (6 animais): α -tocoferol nas seguintes concentrações 2mg/mL, 1,5mg/mL, 1mg/mL, 0,5mg/mL, 0,3mg/mL;
- **Grupo controle** (6 animais): rutina nas seguintes concentrações 2mg/mL, 1,5mg/mL, 1mg/mL, 0,5mg/mL, 0,3mg/mL;
- **Grupo derivado hidrossolúvel** (6 animais): rutina succinil nas seguintes concentrações 3mg/mL, 2mg/mL, 1,5mg/mL, 1mg/mL, 0,5mg/mL;
- **Testes preliminares** (10 animais): critério para uma validação de método para avaliação da atividade antioxidante do α -tocoferol e da rutina.

A área suprimida dos gráficos para a determinação anti-radical das amostras foi calculada usando Microcal Origin 6.0.

4 CONCLUSÃO

A introdução de grupos carboxilatos nas hidroxilas dos grupamentos glicosídicos da molécula de rutina, por meio de um novo processo sintético, proporcionou um grande aumento em sua solubilidade em água.

As estruturas químicas da rutina succinil, rutina ftaloil e rutina fenil-glutaroil foram confirmadas através da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear RMN ^1H e espectroscopia no Infravermelho (IV).

Através do resultado do ensaio de eletroforese capilar avaliou-se a efetiva purificação das amostras e pelo resultado do coeficiente de extinção molar e do espectro de absorção UV concluiu-se que poderia ter ocorrido uma discreta modificação no núcleo flavonóide.

Com isto, foi possível verificar as propriedades antioxidantes do derivado hidrossolúvel da rutina, principalmente da rutina succinil, no teste do ácido 2-tiobarbitúrico, devido ser um composto bastante interessante pela sua baixa toxicidade (FDA. U.S. Food and Drug Administration, 2005).

Já no ensaio de anti-radicais, a rutina ftaloil foi entre os derivados hidrossolúveis o que apresentou um melhor resultado devido a sinergia do anel aromático com o núcleo flavonóide. Apesar das modificações químicas, os outros derivados, rutina succinil e rutina fenil-glutaroil, também apresentaram atividade de seqüestramento de radical livre, concluindo que a discreta modificação ocorrida no núcleo flavonóide não foi suficiente para impedir sua atividade de seqüestro de radicais livres.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ACKER, S.A.B.E.V.; KOYMANS, L.M.H.; BAST, A. Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.15, p.311-328, 1993.
- ACKER, S.A.B.E.V.; BERG, D.J.V.B.; TROMP, M.N.J.L.; GRIFFIOEN, D.H.; BENNEKOM, W.P.V.; VIJGH, W.J.F.V.D.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.20, n.3, p.331-342, 1996.
- AFANAS'EV, I.B.; DOROZHKO, A.I.; BRODSKII, A.V.; KOSTYUK, V.A.; POTAPOVITCH, A.I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, Amsterdam, v.38, n.11, p.1763-1769, 1989.
- ALLUIS, B.; PÉROL, N.; EL HAJJÍ, H.; DANGLES, O. Water-soluble flavonol (=3-hydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) derivatives: chemical synthesis, colouring and antioxidant properties. **Helv. Chim. Acta**, Weinheim, v.83, p.428-443, 2000.
- AMIĆ, D.; DAVINDOVIĆ-AMIĆ, D.D.; BESLO, D.; TRINAJSTIĆ, N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Croat. Chem. Acta**, Zagreb, v.76, n.1, p.55-61, 2003.
- ARORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.24, n.9, p.1355-1363, 1998.

* As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

- ARUOMA, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food Chem. Toxicol.**, Amsterdam, v.32, n.7, p.671-683, 1994. [Review].
- BARBER, A.D.; HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **Am. Pharm.**, Washington, v.34, p.26-35, 1994.
- BARROS, S.B.M.; TEIXEIRA, D.S.; AZNAR, A.E.; MOREIRA, J. A.; ISHII, I.; FREITAS, P.C.D. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Photomorphe umbellata* L. Miq. (Pariparoba). **Free Radical Res. in Latin America**, v. 48, n.1/2, p. 114-116, 1996.
- BASTOS, E.L.; ROMOFF, P.; ECKERT, C.R.; BAADER, W.J. Evaluation of antiradical capacity by H₂O₂-Hemin-induced luminol chemiluminescence. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.51, p.7481-7488, 2003.
- BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.186, p.343-355, 1990.
- BOTSOGLOU, N.A.; FLETOURIS, D.J.; PAPAGEORGIOU, G.E.; VASSILOPOULOS, V.N.; MANTIS, A.J.; TRAKATELLIS, A.G. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.42, p.1931-1937, 1994.
- BRAND-WILLIAMS, W.; BONDET, V.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH[•] free radical method. **Lebensm.-Wiss. Technol.**, Amsterdam, v.30, p.609-615, 1997.
- BRIVIBA, K.; SIES, H. Nonenzymatic antioxidant defense systems. In: FREI, B. **Natural antioxidants in human health and disease**. San Diego: Academic Press, 1994. p.107-128.
- BROUILLARD, R.; MAZZA, G.; SAAD, Z.; ALBRECHT-GARY, A.M.; CHEMINAT, A. The copigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v.111, p.2604-2610, 1989.

- BRUICE, P.Y. Substitution reactions of alkyl halides. In: _____. **Organic chemistry**. 4.ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2004. p.390.
- BRUNETON, J. Flavonoids. In: _____. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. 2.ed. Paris: Lavoisier; Secaucus: Intercept, 1999. p.225-405.
- CALIAS, P.; GALANOPOULOS, T.; MAXWELL, M.; KHAYAT, A.; GRAVES, D.; ANTONIADES, H.N.; ALARCAO, M. Synthesis of inositol 2-phosphate-quercetin conjugates. **Carbohydrate Res.**, Boston, v.292, p. 83-90, 1996.
- CHAVES, M.M.F.; USBERTI, R. Prediction of *Dimorphandra mollis* Benth. (“faveiro”) seed longevity. **Rev. Bras. Bot.**, São Paulo, v.26, n.4, p.557-564, 2003.
- COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.111, p.918-931, 1989.
- COUCH, J.F.; NAGHSKI, J.; KREWSON, C.F. Buckwheat as a source of rutin. **Science**, Washington, v.103, p.197-198, 1946.
- DUARTE, J.; PEREZ-VIZCAINO, F.; ZARZUELO, A.; JIMENEZ, J.; TANARGO, J. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v.239, p.1-7, 1993.
- FDA. U.S. Food and Drug Administration. **Part 172 - food additives permitted for direct addition to food for human consumption**. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.275>. Acesso em: 26 junho 2005.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v.43, n.1, p.61-68, 1997.
- FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chem.**, Amsterdam, v.59, n.3, p.345-353, 1997.

- FONSECA, F.N.; KATO, M.J.; OLIVEIRA Jr., L.; PINTO NETO, N.; TAVARES, M.F.M. Critical assessment of electrolyte systems for the capillary electrophoresis analysis of phenolic compounds in herb extracts. **J. Microcolumn Sep.**, Eugene, v.13, p.227-235, 2001.
- GUILLÉN-SANS, R.; GUSMÁN-CHOZAS, M. The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Philadelphia, v.38, n.4, p.315-330, 1998.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutr. Rev.**, Secaucus, v.52, n.8, p.253-265, 1994.
- HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food Chem. Toxicol.**, Amsterdam, v.33, n.7, p.601-617, 1995. [Review].
- HARBORNE, J.B. The flavonoids. In: _____, eds. **The flavonoids: advances in research since 1980**. New York: Chapman and Hall, 1988.
- HAUPTMANN, N.; CADENAS, E. Biochemistry of active oxygen. In: SCANDALIOS, J.G., ed. **Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses**. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. p.1-20. (Cold Spring Harbor monograph series, 34).
- HOLLMAN, P.C.H.; HERTOOG, M.G.L.; KATAN, M.B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chem.**, Amsterdam, v.57, n.1, p.43-46, 1996.
- IWATSUKI, M.; TSUCHIYA, J.; KOMURO, E.; YAMAMOTO, Y.; NIKI, E. Effects of solvents and media on the antioxidant activity of α -tocoferol. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1200, p.19-26, 1994.
- JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.9, p.515-540, 1990.

- JOVANOVIC, S.V.; STEENKEN, S.; TOSIC, M.; MARJANOVIC, B.; SIMIC, M.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v.116, p.4846-4851, 1994.
- KATAN, M.B. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. **J. Nutr.**, Bethesda, v.133, p.1806-1814, 2003.
- KEHRER, J.P.; SMITH, C.V. Free radicals in biology: sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases. In: FREI, B., ed. **Natural antioxidants in human health and disease**. San Diego: Academic Press, 1994. p.25-62.
- KHALIFA, T.I.; MUHTADI, F.J.; HASSAN, M.M.A. Rutin. **Anal. Profiles Drug Subst.**, New York, v.12, p.623-675, 1983.
- KRASOWSKA, A.; ROSIAK, D.; SZKAPIAK, K.; LUKASZEWICZ, M. Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds. **Curr. Top. Biophys.**, Lublin, v.24, p.89-95, 2000.
- KRASOWSKA, A.; ROSIAK, D.; SZKAPIAK, K.; OSWIECIMSKA, M.; WITEK, S.; LUKASZEWICZ, M. The antioxidant activity of BHT and new phenolic compounds PYA and PPA measured by chemiluminescence. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, Wroclaw, v.6, p.71-81, 2001.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.N. Biossínteses de aminoácidos, nucleotídeos e moléculas relacionadas. In: _____. **Princípios de bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995. p.523-533.
- LIEN, E.J.; REN, S.; BUI, H.H.; WANG, R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.26, n.3/4, p.285-294, 1999.
- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v.37, n.3, p.293-303, 2001.

- LISSI, E.A.; CÁCERES, T.; VIDELA, L.A. Visible chemiluminescence from rat brain homogenates undergoing autoxidation. I. Effect of additives and products accumulation. **J. Free Radicals Biol. Med.**, Elmsford, v.2, p.63-69, 1986.
- LISSI, E.; PASCUAL, C.; CASTILLO, M.D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) thermolysis. **Free Radical Res. Commun.**, Chur, v.17, n.5, p.299-311, 1992.
- LISSI, E.; HANNA-SALIM, M.; PASCUAL, C.; CASTILLO, M.D. Evaluation of total antioxidant potencial (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminal-enhanced chemiluminescence measurements. **J. Free Radicals Biol. Med.**, Elmsford, v.18, p.153-158, 1995.
- LOGANI, M.K.; DAVIES, R.E. Lipid oxidation: biologic effects and antioxidants: a review. **Lipids**, Champaign, v.15, n.6, p.485-495, 1979.
- MANACH, C.; MORAND, C.; DEMIGNÉ, C.; TEXIER, O.; RÉGÉRAT, F.; RÉMÉSY, C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.409, p.12-16, 1997.
- MANN, J.; DAVIDSON, R.S.; HOBBS, J.B.; BANTHORPE, D.V.; HARBORNE, J.B. **Natural products**: their chemistry and biological significance. Essex: Addison Wesley Longman, 1994. p.361-388.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Revisión: Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr. Hosp.**, Madrid, v.17, n.6, p.271-278, 2002.
- MAZUR, L.; TOKARSKA, J.; KAZIOL, A.E.; KOPACZ, M. Ammonium quercetin-5'-sulfonate formamide solvate. **Acta Cryst.**, Great Britain, E60, p. 779-781, 2004.
- McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.224, p.6049-6055, 1969.

- MEDIĆ-SARIĆ, M.; JASPRICA, I.; SMOLCIĆ-BUBALO, A.; MORNAR, A. Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. **Croat. Chem. Acta**, Zagreb, v.77, n.1/2, p.361-366, 2004.
- MERCK index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13ed. Whitehouse Station: Merk Research Laboratories, 2001.
- MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory function. **Biochem. Pharmacol.**, Amsterdam, v.43, p.1167-1179, 1992.
- MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.A. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. **Free Radical Res.**, Basingstoke, v.26, p.195-199, 1997.
- NAGUIB, Y.M.A. A fluorometric method for measurement of oxygen radical-scavenging activity of water-soluble antioxidants. **Anal. Biochem.**, New York, v.284, p.93-98, 2000.
- NIKI, E. Free radical initiations as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.186, p.100-108, 1990.
- OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.H.; BUIJSMAN, M.N.C.P.; AMELVOORT, J.M.M.; KATAN, M.B. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. **J. Nutr.**, London, v.133, p.1806-1814, 2003.
- OOMAH, B.D.; MAZZA, G. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. **J. Agric Food Chem.**, Columbus, v.44, p.1746-1750, 1996.
- PACE, C.N.; VAJDOS, F.; FEE, L.; GRIMSLEY, G.; GRAY, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Sci.**, Woodbury, v.4, p.2411-2423, 1995.
- PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A.K. Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**, Amsterdam, v.57, n.5, p.371-389, 1991.

- PORTER, N.A. Chemistry of lipid peroxidation. **Method. Enzymol.**, San Diego, v.105, p.273-282, 1984.
- PORTER, N.A.; CALDWELL, S.E.; MILLS, K.A. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, Champaign, v.30, n.4, p.277-290, 1995.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; BOLWELL, G.P.; BRAMLEY, P.M.; PRIDHAM, J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Res.**, Basingstoke, v.22, n.4, p.375-383, 1995.
- ROMAY, C.; CASTILLO, M.C.; PASCUAL, C.; CAMPOS, A.M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E.A. Evaluation of the total content of antioxidants in complex mixtures. **Free Radical Res. Latin Am.**, v.48, n.1/2, p.86-95, 1996.
- RUSZNYÁK, S.; SZENT-GYÖRGYI, A. Vitamin P: flavonols as vitamins. **Nature**, Basingstoke, v.138, p.27, 1936.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Sci. Technol. Int.**, Tokyo, v.8, n.3, p.121-137, 2002.
- SHAHIDI, F. Natural antioxidants: an overview. In: _____. **Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications**. Champaign: AOCS Press, 1997. p.1-11.
- SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew. Chem., Int. Ed.**, Weinheim, v.25, p.1058-1071, 1986.
- SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Quim. Nova**, São Paulo, v.22, n.1, p.94-103, 1999.
- SINNHUBER, R.O.; YU, T.C. Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. **Food Res.**, Chicago, v.23, p.626-633, 1958.

- SMITH, C.V.; ANDERSON, R.E. Methods for determination of lipid peroxidation in biological samples. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.3, p.341-344, 1987.
- SOHAL, R.S.; ALLEN, R.G. Relationships between oxygen metabolism, aging and development. **Adv. Free Radical Biol. Med.**, New York, v.2, p.117, 1986.
- STOCKS, J.; GUTTERIDGE, J.M.C.; SHARP, R.J.; DORMANDY, T.L. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. **Clin. Sci. Mol. Med.**, London, v.47, n.3, p.212-222, 1974.
- THOMSON, C.; BLOCH, A.; HASLER, C.M. Position of the American Dietetic Association: functional foods. **J. Am. Diet. Assoc.**, Orlando, v.99, n.10, p.1280-1281, 1999.
- TREASE, G.E.; EVANS, W.C. Phenols and phenolic glycosides. In: _____. **Pharmacognosy**. 14.ed. London: W.B. Saunders, 1996. p.218-254.
- YAO, L.H.; JIANG, Y.M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S.S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods Hum. Nutr.**, Dordrecht, v.59, p.113-122, 2004.
- YILDZOGLE-ARI, N.; ALTAN, V.M.; ALTINKURT, O.; OZTURK, Y. Pharmacological effects of rutin. **Phytother. Res.**, Borgnor Regis, v.5, n.1, p.19-23, 1991.
- YOKOZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z.W.; SHIMIZU, M. Antioxidative activity of flavones and flavonols *in vitro*. **Phytother. Res.**, Borgnor Regis, v.11, p.446-449, 1997.
- WAYNER, D.D.M.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.; LOCKE, S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. **FEBS J.**, Oxford, v.187, n.1, p.33-37, 1985.
- WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonoids. **Free Radical Biol. Med.**, Orlando, v.36, n.7, p.829-837, 2004.

WILBUR, K.M.; BERNHEIM, F.; SHAPIRO, O.W. The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.24, p.305-313, 1949.

ANEXO A – Características físico-químicas dos reagentes utilizados na parte experimental[†]

RUTINA

Características	Rutina [153-18-4]
Forma Física	Pó cristalino amarelo, inodoro e insípido. Apresenta um escurecimento gradual com a exposição à luz.
Propriedades dos cristais	Os cristais contém 3H ₂ O e torna-se anidro após 12 horas a 110 °C e 10mmHg.
Ponto de fusão	Rutina anidra a 125 °C é marrom. Funde-se a 188,7 °C e torna-se plástica a 195-197 °C. Decompõe-se a 214-215 °C (com efervescência).
Nome Químico	3-[[6-O-(6-Deoxy- α -L-manopiranosil)- β -D-glicopiranosil]oxi]-2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4H-1-benzopira-4-ona
Outras Denominações	Rutoside, quercetina-3-rutinoside, melin, eldrin, ilixatin, soforin, violaquercitrina
Principais Fontes	Encontrado em muitas plantas, especialmente em trigo sarraceno: <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench., Polygonaceae, o qual contém cerca de 3% (base seca). Nas folhas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L., Solanaceae) e <i>Ruta graveolens</i> , Rutaceae
Fórmula Mínima	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
Peso Molecular	610,53 C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ . 3H ₂ O = 664,60
Composição Química (%)	C 53,11% H 4,95% O 41,93%
Rotação Óptica	$[\alpha]_D^{23} + 13,82^\circ$ [etanol] $[\alpha]_D^{23} - 39,43^\circ$ [piridina]
Solubilidade	Um grama (1g) dissolve-se em 8 litros de água, quando em ebulição em 200mL e em 7mL de metanol em ebulição. Solúvel em piridina, formamida e soluções alcalinas. Levemente solúvel em álcool, acetona, etiléter, benzeno e solventes de petróleo. Praticamente insolúvel em clorofórmio e éter. Em soluções diluídas com cloreto férrico, apresenta coloração verde.
Estabilidade e Incompatibilidade	Rutina é mais estável que a quercetina na presença de baixas concentrações de álcalis. Em soluções ácidas, a rutina é hidrolisada em quercetina, a qual esta é relativamente estável nestas condições. Deve ser armazenada em locais escuros. A rutina é incompatível com ácidos e sais de metais pesados.
LD₅₀	i.v. em ratos: 950mg/Kg
Uso Médico	Vasoprotetor

[†] Informações retiradas do MERCK index. 13ed. Whitehouse Station: Merk Research Laboratories, 2001.

ANIDRIDO FTÁLICO

Características	Anidrido Ftálico [0085-44-9]
Forma Física	Sólido: branco na forma de agulhas brancas.
Ponto de Fusão e Ebulição	Ponto de fusão: 130,8 °C. Ponto de ebulição (760 mmHg): 295 °C
Nome Químico	Anidrido do ácido 1,2 benzeno di-carboxílico
Fórmula Mínima	C ₈ H ₄ O ₃
Peso Molecular	148,12
Composição Química (%)	C 64,81% H 2,70% O 32,40%
Densidade	d ₄ ²⁵ 1,527
Solubilidade (à 25°C (g/100g de solvente))	Solubilidade em: 162 partes de água com conversão para ácido ftálico, 125 partes de sulfeto de carbono, álcool, parcialmente solúvel em éter.
Toxicidade Humana	Altamente irritante para pele, olhos e mucosas.
Uso	Ácido benzóico, índigo sintético, resinas artificiais, ftalatos.

ANIDRIDO SUCCÍNICO

Características	Anidrido Succínico [108-30-5]
Forma Física	Prismas ortómbicos
Ponto de Fusão e Ebulição	Ponto de fusão: 119,6 °C. Ponto de ebulição (760 mmHg): 261 °C
Nome Químico	Anidrido butanedióico.
Fórmula Mínima	C ₄ H ₄ O ₃
Peso Molecular	100,07
Composição Química (%)	C 48,01% H 4,03% O 47,96%
Densidade	d ₄ ²⁵ 1,503
Solubilidade (à 25°C (g/100g de solvente))	Clorofórmio, tetracloreto de carbono, álcool, muito pouco solúvel em éter e água.
Toxicidade Humana	Altamente irritante para pele, olhos e mucosas.

ANIDRIDO 2-FENIL-GLUTÁRICO

Características	Anidrido Fenil-glutárico [2959-96-8]
Forma Física	Sólido: branco na forma de agulhas cristalinas.
Ponto de Fusão e Ebulição	Ponto de fusão: 95-99 °C. Ponto de ebulição (760 mmHg): 218 °C
Fórmula Mínima	C ₁₁ H ₁₀ O ₃
Peso Molecular	190,20
Composição Química (%)	C 69,40% H 5,25% O 25,23%
Toxicidade Humana	Altamente irritante para pele, olhos e mucosas.

ACETATO DE ETILA

Características	Acetato de etila [141-78-6]
Forma Física	Líquido volátil e claro, odor característico de frutas, gosto agradável quando diluído.
Ponto de Fusão e Ebulição	Ponto de fusão: -83 °C. Ponto de ebulição (760 mmHg): 77 °C
Nome Químico	Éter acético
Fórmula Mínima	$C_4H_8O_2$
Peso Molecular	88,10
Composição Química (%)	C 54,53% H 9,15% O 36,32%
Densidade	d_4^{20} 0,902
Solubilidade	1 mL dissolve em 10 mL de água a 25 °C. Miscível com álcool, acetona, clorofórmio e éter.
Toxicidade Humana	Vapores podem irritar as mucosas das membranas. Inalação prolongada pode causar dano renal, pulmonar, hepático e cardíaco.
Uso	Essências artificiais de frutas, solvente para nitrocelulose. Usado em perfumes e filmes fotográficos.

ACETONITRILA

Características	Acetonitrila
Forma Física	Líquido com o mesmo odor do éter.
Ponto de Fusão e Ebulição	Ponto de fusão: - 45 °C. Ponto de ebulição (760 mmHg): 81,6 °C.
Nome Químico	Cianometano
Fórmula Mínima	C_2H_3N
Peso Molecular	41,05
Composição Química (%)	C 58,52% H 7,37% N 34,12%
Densidade	d_4^{25} 0,78745
Viscosidade	η_D^{20} 1,34604
Solubilidade	Miscível com água, metanol, acetato de metila, acetato de etila, acetona, éter, clorofórmio e tetracloreto de carbono. Imiscível com muitas frações de hidrocarbonetos saturados.
Toxicidade Humana	Pode causar asfixia, náusea, vômito e convulsões.
Uso	Em sínteses orgânicas como reagente para acetofenona, ácido α -naftalenoacético e tiamina. Para extração de ácidos graxos dos óleos de fígado de bacalhau e óleos animais e vegetais. Pode ser usado para recrystalizar esteróides.

CLOROFÓRMIO

Características	Clorofórmio [67-66-3]
Forma Física	Líquido adocicado, muito volátil, não-inflamável, altamente refrativo.
Ponto de Fusão e Ebulição	Ponto de solidificação: -63,5 °C. Ponto de ebulição (760 mmHg): 61-62 °C.
Nome Químico	Triclorometano
Fórmula Mínima	CHCl_3
Peso Molecular	119,39
Composição Química (%)	C 10,05% H 0,84% O 89,10%
Densidade	d_{20}^{20} 1,484
Viscosidade	η_D^{20} 1,4476
Solubilidade	1 mL dissolve em aproximadamente 200 mL de água a 25 °C,. Miscível com álcool, benzeno, éter, tetracloreto de carbono, óleos.
Toxicidade Humana	Altas doses pode causar hipotensão, depressão respiratória e do miocárdio e morte.
Uso	Como solvente para óleos, borracha, alcalóides, graxas, resinas.

ETANOL

Características	Etanol
Forma Física	Líquido inflamável, incolor, gosto ardente.
Ponto de Fusão e Ebulição	Ponto de fusão: -114,1 °C. Ponto de ebulição (760 mmHg): 78,5 °C
Nome Químico ou outras denominações	Álcool absoluto, álcool anidro.
Fórmula Mínima	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$
Peso Molecular	46,07
Composição Química (%)	C 52,14% H 13,13% O 34,73%
Densidade	d_4^{20} 0,789
Viscosidade	η_D^{20} 1,361
Solubilidade	Miscível com água e muitos solventes orgânicos.
Uso	Usado em bebidas alcoólicas. Solvente em laboratórios e indústrias, na produção de álcool denaturado, farmacêutico e para síntese orgânica.

ÉTER

Características	Éter [60-29-7]
Forma Física	Líquido altamente inflamável, muito volátil. Odor característico, adocicado.
Ponto de Fusão e Ebulição	Ponto de fusão: -116,3 °C. Ponto de ebulição (760 mmHg): 36 °C
Nome Químico	Etoxietano, dietiléter, éter sulfúrico
Fórmula Mínima	C ₄ H ₁₀ O
Peso Molecular	74,12
Composição Química (%)	C 64,82% H 13,60% O 21,58%
Densidade	d ₄ ²⁰ 0,7134
Solubilidade	Levemente solúvel em água, miscível com álcoois alifáticos baixos, benzeno, clorofórmio e óleos.
Toxicidade Humana	Dor de cabeça, narcose, náusea, vômito, irritação nos olhos e pele.
Uso	Solvente para graxas, óleos, gorduras, perfumes, alcalóides. Importante reagente para síntese orgânica. Principal solvente para a extração de ativos de plantas e tecidos animais.

GLICERINA

Características	Glicerina
Forma Física	Líquido viscoso e com gosto adocicado.
Ponto de Fusão e Ebulição	Ponto de fusão: 17,8 °C. Ponto de ebulição (760 mmHg): 290 °C.
Nome Químico	1,2,3-propanotriol, glicerol
Fórmula Mínima	C ₃ H ₈ O ₃
Peso Molecular	92,09
Composição Química (%)	C 39,13% H 8,76% O 52,12%
Densidade	d ₂₀ ²⁰ 1,25075
Viscosidade	η _D ¹⁵ 1,4758
Solubilidade	Miscível com água, álcool. Uma parte se dissolve em 11 partes de acetato de etila, em aproximadamente em 500 partes de éter etílico. Insolúvel em benzeno, clorofórmio, tetracloreto de carbono, dissulfeto de carbono e óleos.
Uso	Solvente, umectante, emoliente, na fabricação de nitroglicerina (dinamite), cosméticos e lubrificantes.

N-N-DIMETIL FORMAMIDA

Características	N-N-Dimetil formamida [68-12-2]
Forma Física	Líquido com odor fraco de amina.
Ponto de Fusão e Ebulição	Ponto de fusão -61 °C. Ponto de ebulição (760 mmHg): 153 °C, (39 mmHg): 76 °C, (3,7 mmHg): 25 °C
Nome Químico	N-N-Dimetil formamida
Outras Denominações	DMF
Fórmula Mínima	C ₃ H ₇ NO
Peso Molecular	73,09
Composição Química (%)	C 49,30% H 9,65% N 19,17% O 21,89%
Densidade	d ₄ ²⁵ 0,9445
Viscosidade	η _D ²⁵ 1,42803
Solubilidade	Miscível com água e com os solventes orgânicos mais comuns. É um bom carreador de solventes para gases. Vapores pode ser absorvido pela pele.
Toxicidade Humana	Altamente irritante para pele, olhos e mucosas. A injúria em fígados têm sido produzida em animais experimentais por inalação prolongada de 100 ppm.
Uso	Solvente para líquidos e gases. Na formulação de compostos orgânicos. Solvente para Orlon e fibras poliacrílicas similares. Conhecido como solvente orgânico universal.

N-HEXANO

Características	n-Hexano [110-54-3]
Forma Física	Líquido muito volátil e incolor, odor fraco e peculiar.
Ponto de Fusão e Ebulição	Ponto de fusão -95 °C a -100 °C. Ponto de ebulição 69 °C
Nome Químico	n-Hexano
Fórmula Mínima	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃
Peso Molecular	86,17
Composição Química (%)	C 83,62% H 16,38%
Densidade	d ₄ ²⁰ 0,660
Viscosidade	η _D ²⁰ 1,375
Solubilidade	Insolúvel em água, miscível com álcool, clorofórmio e éter.
Toxicidade Humana	Concentrações letais para camundongos no ar é aproximadamente 40.000 ppm. Pode ser irritante para o trato respiratório, e em altas concentrações ser narcótico.
Uso	Determinação do índice de refração de minerais, ligante de termômetros de mercúrio.

METANOL

Características	Metanol [67-56-1]
Forma Física	Líquido tóxico. Quando puro pode apresentar um leve odor alcoólico. Queima com uma chama não luminosa.
Ponto de Fusão e Ebulição	Ponto de fusão: -97,8 °C. Ponto de ebulição (760 mmHg): 21,2 °C.
Nome Químico	Álcool metílico
Fórmula Mínima	CH ₃ OH
Peso Molecular	32,04
Composição Química (%)	C 37,48% H 12,58% O 49,93%
Densidade	d ₄ ²⁵ 0,7866
Solubilidade	Miscível com água, etanol, éter, benzeno, cetonas e maioria de solventes orgânicos
Toxicidade Humana	Envenenamento pela ingestão, inalação e absorção percutânea. Pode causar dor de cabeça, fadiga, náusea, acidose, cegueira, falha respiratória e morte.
Uso	Solvente industrial. Matéria-prima para fabricação de formaldeído e ácidos inorgânicos. Solventes para polímeros e denaturante do álcool.

PIRIDINA

Características	Piridina [110-86-1]
Forma Física	Líquido inflamável e incolor, odor desagradável característico, gosto forte.
Ponto de Fusão e Ebulição	Ponto de fusão -42 °C Ponto de ebulição 115 – 116 °C
Nome Químico	Piridina
Fórmula Mínima	C ₅ H ₅ N
Peso Molecular	79,10
Composição Química (%)	C 75,92% H 6,37% N 17,71%
Densidade	d ₄ ²⁵ 0,9780
Viscosidade	η _D ²⁰ 1,5102
Solubilidade	Forma uma mistura azeotrópica com 3 mols de água, ponto de ebulição 92-93 °C. Volátil com vapor. Miscível com água, álcool, éter, éter de petróleo, óleos e muitos líquidos orgânicos. É um bom solvente para muitos compostos orgânicos e inorgânicos. É uma base fraca e forma sais com ácidos fortes. pKa 5,19
Toxicidade Humana	Concentração letal para ratos no ar: 4000 ppm. Pode causar depressão do sistema nervoso central e irritação da pele e trato respiratório. Largas doses pode produzir distúrbios gastro intestinais, dano ao fígado e rins.
Uso	Como solvente para sais minerais anidro, em síntese orgânica e química analítica.

ANEXO B – Espectros na Região do Infravermelho (IV) e Espectros de RMN ^1H

Figura 34. Espectro de infravermelho da rutina

Figura 35. Espectro de infravermelho da rutina succinil

Figura 36. Espectro de infravermelho da rutina fthaloyl

Figura 37. Espectro de infravermelho da rutina fenil-glutaroyl

Figura 38. Espectro de RMN ^1H (300MHz, $\text{C D}_3\text{OD}$) de rutina

Figura 39. Espectro de RMN ^1H (300MHz, D_2O) de rutina succinil

Figura 40. Espectro de RMN ^1H (300MHz, D_2O) de rutina fialoil

Figura 41. Espectro de RMN ^1H (300MHz, (D_6) DMSO) de rutina fenil-glutaroil