

VANESSA JÓIA DE MELLO

**EFEITOS HIPOLIPIDÊMICOS E TOXICOLÓGICOS DE COMPLEXOS DE
RUTINA COM ORGANOESTÂNICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

2001

VANESSA JÓIA DE MELLO

**EFEITOS HIPOLIPIDÊMICOS E TOXICOLÓGICOS DE COMPLEXOS DE
RUTINA COM ORGANOESTÂNICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de agosto de 2001.

Tanus Jorge Nagem
(Conselheiro)

José Roberto da Silveira Maia
(Conselheiro)

Cremilda Rosa da Silva

Geraldo Magela Lima

Tânia Toledo de Oliveira
(Orientadora)

**Dedico esta tese aos meus queridos pais
Gercide J6ia de Mello e H6lio Marins de Mello,
pelo imenso amor, carinho, apoio, confian7a
e incentivo em todas as etapas de minha vida.**

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por estar sempre presente em minha vida, iluminando todos os meus caminhos, me encorajando e me abençoando.

Aos meus pais, pelo imenso amor, pelo exemplo de vida, educação e confiança concedida em todas as decisões por mim tomadas.

A minha querida avó Almira Brito Jóia (*in memoriam*) por todo carinho e amor dedicados.

Ao meu irmão Nilson, a minha cunhada Marizete e a minha sobrinha Danielly pelo amor, apoio, confiança e carinho.

Ao meu irmão Marcos pelo amor, confiança e carinho.

À professora Tânia Toledo de Oliveira, pela orientação, compreensão, sincera amizade e ensinamentos oferecidos durante todo período de minha formação.

Ao professor Tanus Jorge Nagem, pelos seus aconselhamentos, apoio e amizade.

Ao professor José Roberto da Silveira Maia pela orientação, atenção dispensada e ensinamentos a mim conferidos.

A Maria Aparecida Leão pela amizade, enorme carinho e apoio oferecido durante toda a realização deste trabalho.

Ao José Geraldo Pinto, pela amizade e apoio indispensável.

Ao amigo Leonardo Ramos Paes de Lima pela amizade, apoio e grande ajuda nas realizações das dosagens dos constituintes sanguíneos

A todos os colegas do laboratório Biofarmacos.

Ao José Francisco da Silva (Juquinha), pelo fornecimento dos coelhos, pela dedicação e boa vontade durante os experimentos.

Ao Samuel Araújo Figueiredo, pela insubstituível presença, amor, carinho e apoio em todos momentos.

Ao senhor Matozinho Figueiredo e a senhora Maria Francisca Araújo Figueiredo pelo apoio, consideração e imenso carinho.

As minhas grandes companheiras Iara Lança Lopes, Lívia de Almeida Carvalho e Juliana Machado pela amizade, dedicação, carinho e imensurável apoio durante as horas boas e ruins dessa longa caminhada.

A Jandira Rodrigues Teixeira pelo carinho e grande amizade

Aos meus grandes amigos Letícia P. F. Fóes, Cynthia M. Loureiro, Tadeu C. dos Santos, Juliana Nunes Fraga, Antônio Carlos Roriz Moraes, Flavia Loreiro Barbosa, Renata Casto Viana e Ingrid Vellenich, pelo carinho e apoio ao longo desta minha jornada.

À Silvana Lages Ribeiro Garcia, pela amizade e orientações.

À Universidade Federal de Viçosa pela estrutura fundamental fornecida em toda as etapas de minha formação.

Ao CAPES, pelo financiamento do projeto e fornecimento da bolsa.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram na realização deste trabalho e na conquista de mais essa etapa em minha vida.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMO | ix |
| ABSTRACT | xi |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 2.1. Flavonóides | 4 |
| 2.1.1. Fonte e consumo de flavonóides | 6 |
| 2.1.2. Atividades biológicas e propriedades farmacológicas dos flavonóides | 7 |
| 2.2. Efeitos farmacológicos de Rutina e suas propriedades | 11 |
| 2.3. Organoestânicos e suas propriedades biológicas | 13 |
| 2.4. Metabolismo lipídico | 15 |
| 2.4.1. Lipídios | 15 |
| 2.4.2. Ácidos graxos livres | 15 |
| 2.4.3. Triacilgliceróis | 16 |
| 2.4.4. Colesterol | 17 |
| 2.4.5. Digestão e absorção de lipídios | 20 |
| 2.5. Transporte dos lipídios | 22 |
| 2.5.1. Lipoproteínas; função e papel metabólico | 22 |
| 2.5.1.1. Constituição das lipoproteínas | 23 |
| 2.5.1.2. Quilomícrons | 24 |
| 2.5.1.3. Lipoproteína de muito baixa densidade- VLDL | 26 |
| 2.5.1.4. Lipoproteínas de baixa densidade- LDL | 27 |
| 2.5.1.5. Lipoproteína de alta densidade HDL | 28 |
| 2.5.1.6. Lipoproteína (a) | 29 |
| 2.6. Disfunções lipidêmicas | 30 |
| 2.6.1. Doenças aterosclerótica cardiovasculares e a relações com lipídios séricos | 30 |
| 2.7. Papéis de lipoproteínas em coronariopatias (CHD): | 32 |
| 2.8. Fatores de riscos de arterosclerose | 34 |

| | |
|--|----|
| 2.8.1. Fatores de risco incontrolláveis | 35 |
| 2.8.2. Fatores de risco controláveis não lipídicos | 25 |
| 2.9. Atorvastatina cálcica | 26 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 40 |
| 3.1. Síntese dos complexos do flavonóide rutina com os organoestânicos [SnCl ₂ Ph ₂], [SnClPh ₃], [SnCl ₃ Ph] e [SnCl ₄] | 40 |
| 3.1.1. Procedimento Experimental | 40 |
| 3.1.1.1. Reação de rutina com o organoestânico [SnCl ₂ Ph ₂] (SN1)..... | 40 |
| 3.1.1.2. Reação da rutina com o organoestânico [SnClPh ₃] (SN2)..... | 41 |
| 3.1.1.3. Reação da rutina com o organoestânico [SnCl ₃ Ph] (SN3)..... | 41 |
| 3.1.1.4. Reação de Rutina com o organoestânico [SnCl ₄] (SN4)..... | 41 |
| 3.2. Preparo das cápsulas utilizadas | 42 |
| 3.3. Ensaio biológicos | 43 |
| 3.3.1. Modelo experimental do ensaio biológico com hiperlipidemia induzida | 43 |
| 3.3.1.1. Determinação do colesterol-total | 45 |
| 3.3.1.2. Determinação do triacilglicerol..... | 45 |
| 3.3.1.3. Determinação do colesterol-HDL..... | 46 |
| 3.3.1.4. Determinação do colesterol-LDL | 47 |
| 3.3.2. Modelo experimental para ensaio de toxicologia aguda de 30 dias | 38 |
| 3.3.2.1. Determinação de proteínas totais | 49 |
| 3.3.2.2. Determinação de albumina | 50 |
| 3.3.2.3. Determinação da uréia | 50 |
| 3.3.2.4. Determinação de ácido úrico..... | 51 |
| 3.3.2.5. Determinação da concentração de glicose | 52 |
| 3.3.2.6. Determinação de bilirrubina total..... | 52 |
| 3.3.2.7. Determinação de cálcio..... | 53 |
| 3.3.2.8. Determinação de fósforo..... | 53 |
| 3.3.2.9. Determinação de transaminase glutâmico pirúvico (TGP)..... | 54 |
| 3.1.2.10. Determinação da transaminase glutâmico oxalacético (TGO) | 54 |

| | |
|---|-----|
| 3.1.2.11. Determinação cinética da atividade γ glutamil transferase (Gama-GT)..... | 55 |
| 3.3. Testes estatísticos | 56 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 57 |
| 4.1. Caracterização dos complexos do flavonóide rutina com organoestânicos..... | 57 |
| 4.1.1. Análise de CHN | 57 |
| 4.1.2. Espectroscopia no infravermelho | 58 |
| 4.1.3. Análise de RMN de Sn ¹¹⁹ | 66 |
| 4.1.3.1. Número da coordenação | 66 |
| 4.1.3.2. Efeitos do substituinte e substituição múltipla | 66 |
| 4.1.3.3. Dependência da temperatura | 67 |
| 4.1.3.4. Efeitos de isótopos | 67 |
| 4.2. Primeiro ensaio biológico com duração de 30 dias. Efeito hipolipidêmico dos complexos do Flavonóide rutina com organoestânicos | 72 |
| 4.3. Segundo ensaio biológico com duração de 30 dias - Avaliação dos efeitos toxicológicos dos complexos do flavonóide rutina com os organoestânicos [SnClPh ₃] e [SnCl ₄]..... | 92 |
| 5. CONCLUSÕES GERAIS..... | 137 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 139 |
| APÊNDICE..... | 146 |

RESUMO

MELLO, Vanessa J6ia de, M.S, Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2001.
Efeitos hipolipidêmicos e toxicol6gicos de complexos de rutina com organoestânicos. Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Conselheiros: Tanus Jorge Nagem e José Roberto da Silveira Maia

Dois ensaios biol6gicos foram realizados com o objetivo de avaliar os efeitos hipolipidêmicos e toxicol6gicos de complexos do flavon6ide rutina com organoestânicos [SnCl₂Ph₂], [SnClPh₃], [SnCl₃Ph] e [SnCl₄]. Inicialmente promoveu-se a sântese dos complexos obtendo-se os produtos: [SnCl₂Ph₂(Rut)].H₂O, [SnClPh₃(Rut)].6H₂O, [SnClPh(Rut)].H₂O, [SnCl(Rut)].H₂O, (SN1, SN2, SN3, SN4, respectivamente). Estes produtos foram caracterizados a partir de análise elementar (CHN), ponto de fusão, espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de ¹¹⁹Sn. Em posse dos resultados, realizou-se o primeiro ensaio biol6gico, com complexos sintetizados. Para fins de comparaç6o e avaliaç6o do efeito hipolipidêmico destas substâncias utilizou-se no mesmo ensaio, o flavon6ide rutina isoladamente e a atorvastatina cálcica (presente no medicamento liptor). Estas substancias foram testadas no metabolismo de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, com hiperlipidemia induzida por colesterol (0,5%) + ácido cólico (0,1%) administrados na raç6o dos animais, que receberam as substâncias em estudo encapsuladas, na dose de 5mg/dia. As dosagens foram efetuadas no 1°, 16° e 31° dias de realizaç6o do experimento. Todos os complexos foram eficazes na reduç6o do colesterol total, sendo o mais eficiente o complexo do

flavonóide rutina com o $[\text{SnCl}_4]$ ($[\text{SnCl}(\text{Rut})].\text{H}_2\text{O}$), apresentando um resultado bem similar ao expressado pela atorvastatina cálcica. Dentre os compostos o que promoveu maior elevação da lipoproteína colesterol-HDL foi o complexo do flavonóide rutina com o composto $[\text{SnClPh}_3]$ ($[\text{SnClPh}_3(\text{Rut})].6\text{H}_2\text{O}$) aos 15 dias, e o princípio ativo atorvastatina cálcica aos 30 dias. A redução da lipoproteína colesterol-LDL foi mais pronunciada também pelo complexo do flavonóide rutina com o composto $[\text{SnClPh}_3]$ ($[\text{SnClPh}_3(\text{Rut})].6\text{H}_2\text{O}$). Os complexos não apresentaram taxas satisfatórias de redução da concentração de triacilgliceróis. Os complexos do flavonóide rutina com os organoestânicos $[\text{SnClPh}_3]$, ($[\text{SnClPh}_3(\text{Rut})].6\text{H}_2\text{O}$) e $[\text{SnCl}_4]$ ($[\text{SnCl}(\text{Rut})].\text{H}_2\text{O}$) que apresentaram os melhores resultados no primeiro experimento, foram utilizados na dose de 100 mg/dia, no segundo experimento. Este ensaio biológico foi realizado com a finalidade de obter-se a toxicologia aguda destas substâncias. Efetuaram-se dosagens do colesterol total, triacilgliceróis, colesterol-HDL, glicose, proteínas totais, albumina, bilirrubina total, uréia, ácido úrico, fósforo, cálcio, gama glutamil transferase (Gama-GT) e as transaminase glutâmico-piruvica (TGP) e transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) no 1°, 16° e 31° dias de realização do experimento. Nesta dosagem estas substâncias não apresentaram efeitos hiperlipidêmicos. As concentrações lipídica sanguínea apresentaram uma elevação considerável. Foram observadas elevações nas concentrações das transaminases glutâmico-piruvica (TGP) e glutâmico oxaloacética (TGO) bem como na concentração de ácido úrico aos 30 dias. Para os outros constituintes não se observou efeito tóxico destas substâncias.

ABSTRACT

MELLO, Vanessa J6ia de, M.S, Federal University of Viçosa, August 2001.
Hipolipidemic and toxicologic effects of complexes of rutina with organotin. Adviser: T6ania Toledo de Oliveira. Committee members: Tanus Jorge Nagem and Jose Roberto da Silveira Maia.

Two biological assays were carried out to assess the hipolipidemic and toxicologic effects of the complexes made by the rutin flavonoid added to organotin [SnCl₂Ph₂], [SnClPh₃], [SnCl₃Ph] and [SnCl₄]. The reaction of these two substances put together makes the synthesis of the complexes: [SnCl₂Ph₂(Rut)].H₂O, [SnClPh₃(Rut)].6H₂O, [SnClPh(Rut)].H₂O, [SnCl(Rut)].H₂O, (SN1, SN2, SN3, SN4, respectively). These compounds were characterized by elementary analysis (CHN), melting point, infra-red spectroscopy, nuclear magnetic resonance of ¹¹⁹Sn. One biological assay was carried out with synthesized complexes to assess and compare the hipolipidemic effects of these substances. Two parallel treatments, one with flavonoid rutin and the other with atorvastatin (present in the liptor medicine) were tested in metabolism of rabbits of the White New Zealand race. These substances were tested in metabolism of rabbits with induced hyperlipidemia for cholesterol (0.5%) + colic acid (0.1%) which fed the animals. They received encapsulated substances in study in the dose of 5mg/day. The blood samples were taken on the 1^o, 16^o and 31^o days along the experiment. All the complexes had shown efficiency in reducing the total cholesterol, and the most efficient

complex result to be the flavonoid rutina plus $[\text{SnCl}_4]$ ($[\text{SnCl}(\text{Rut})]\cdot\text{H}_2\text{O}$) presented a quite similar to that expressed by the calcic atorvastatina compound. Among these complexes one that caused the high level of the lipoprotein cholesterol-HDL were ($[\text{SnClPh}_3(\text{Rut})]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) after the 15^o day, and the atorvastatina after 30^oday. The reduction of the lipoprotein cholesterol-LDL more intensive than that caused by ($[\text{SnClPh}_3(\text{Rut})]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) complex. The complexes did not present satisfactory rates of reduction in triglyceride concentration. The complexes ($[\text{SnClPh}_3(\text{Rut})]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) and ($[\text{SnCl}(\text{Rut})]\cdot\text{H}_2\text{O}$), which presented the best results in the first experiment were used in the dose 100 of mg/day in second experiment. This biological assay was carried out to reach a acute toxicology of these substances. Rates of total cholesterol, triglyceride, cholesterol-HDL, glucose, proteins, albumen, total bilirubin, urea, acid úrico, phosphorus, calcium, glutamil gamma transferase (Gama-GT), alanine aminotransferase (GPT) and aspartate aminotransferase (GOT) were analized on 1^o, 16^o and 31^o days of the experimental period. In this dosagem these substances did not present hiperlipidemic effect. The lipidic concentrations in the blood presented a considerable rise. There were high concentrations of alanine aminotransferase (GPT) and aspartate aminotransferase (GOT) after 15^o and 30^o days of treatment but concentration of uric acid was high only after 30^o days. No toxicologic effects was observed on the others constituents.

1-INTRODUÇÃO

De acordo com as estatísticas recentes, aproximadamente cinco milhões de pessoas sofrem de doença coronariana isquêmica, que é a principal causa de morte em homens maiores de 35 anos e em pessoas de ambos os sexos depois dos 45 anos. Paralelamente, quase a totalidade das mortes prematuras na América do Norte e em muitos países desenvolvidos (mortes essas definidas de forma arbitrária como aquelas que ocorrem antes dos 65 anos) é causada pela doença coronariana (GINSBERG, 1994; GRUNDY, 1990; BREWER et al., 1998; BOSTOM et al., 1996; FIELDING et al., 1995).

A corianariopatia (CHD) caracteriza-se por um conjunto de doenças que envolvem a rede de vasos sanguíneos que circundam o coração e suprem o miocárdio. É a maior causa de óbito atualmente e responsável por 80% das mortes cardíacas. Embora a maior parte das mortes por CHD ocorra em pessoas acima da idade de 65 anos, os grandes números de mortes prematuras levaram a pesquisas extensas nas áreas de identificação e prevenção. Acumulou-se uma literatura monumental a partir de estudos epidemiológicos, laboratoriais, clínicos, prospectivos e intervencionais, que procuram compreender porque apenas certos indivíduos são levados a CHD, particularmente quando este leva a morte prematura (KRAUSE 1995).

Uma quantidade considerável de dados epidemiológicos de países em todo o mundo enfatiza a relação entre os níveis séricos de colesterol e a incidência de CHD. Dados clínicos e laboratoriais, incluindo estudos com primatas, suportam a relação entre níveis séricos de colesterol e doença cardíaca. Mais recentemente foram conduzidos alguns estudos intervencionais grandes para colaborar com estes achados. Embora os resultados tenham sido inconclusivos ou contraditórios até certo ponto a preponderância de informações associa altos níveis de lipídios séricos com a incidência de aterosclerose e morbidade e mortalidade por CHD. Embora os triacilgliceróis também sejam implicados, a evidência dos primeiros dados, das primeiras pesquisas, levam a hipótese lipídica, que sustenta que reduzir os níveis elevados de colesterol sérico reduz a probabilidade de CHD.

A relação entre colesterol, aterogênese e doença coronariana foi descoberta através de estudos bioquímicos e principalmente epidemiológicos. Assim, foi possível estabelecer com segurança, estreita relação entre as alterações no metabolismo do colesterol e a aterosclerose, ao mesmo tempo em que numerosos estudos têm demonstrado redução da placa aterosclerótica quando se controlam os níveis plasmáticos desta substância (GINSBERG, 1994; GRUNDY, 1990; BREWER et al., 1998; BOSTOM et al., 1996; FIELDING et al., 1995).

Medidas dietéticas isoladas têm se mostrado, de modo geral, insuficientes na redução dos níveis de lipídios plasmáticos. Diversos fármacos e mesmo a associações de alguns destes, encontram-se disponíveis no mercado com a finalidade reduzir a síntese endógena do colesterol ou melhorar a eficiência de sua remoção do plasma. A combinação de seus efeitos tem que satisfatoriamente promover a elevação da fração colesterol-HDL e a redução do colesterol-LDL no plasma agindo assim de forma ideal na prevenção da aterosclerose.

Diversos fatores relacionados a estes medicamentos, tais como o seu elevado custo de produção e comercialização e em alguns casos efeitos colaterais indesejáveis, tem despertado grande interesse na descoberta de novas estratégias nutricionais e, ou, farmacológicas para a prevenção da aterosclerose, baseada principalmente no controle das concentrações plasmáticas de colesterol. De acordo com esta necessidade e da análise da hipótese, cada vez mais estudada, de que a peroxidação lipídica desempenhe um importante papel nos processos patogênicos da aterosclerose vem proporcionando incentivos cada vez maiores na aplicação de antioxidantes como agentes antiaterogênicos (BATLOUNI, 1997).

Dentre as substâncias antioxidantes como o tocoferol, retinol e ácido ascórbico, os flavonóides são provavelmente o grupo de antioxidantes de nossa alimentação mais comuns e mais ativos, sendo sua atividade revelada tanto em sistemas hidrofílicos como lipofílicos, como já mencionado anteriormente. A capacidade antioxidante dos flavonóides é atribuída a seus grupos fenólicos. Em geral, os flavonóides removem os radicais superóxido, oxigênio simpleto e os peróxidos lipídicos, inibindo a oxidação das LDLs e seus efeitos citotóxicos (BATLOUNI, 1997).

Com objetivo de se obter uma redução nos níveis de lipídeos séricos de coelhos e também estudar sua toxicidade, o presente trabalho desenvolveu a complexação do flavonóide rutina com os organoestânicos $[\text{SnCl}_2\text{Ph}_2]$, $[\text{SnClPh}_3]$, $[\text{SnCl}_3\text{Ph}]$ e $[\text{SnCl}_4]$. Complexos com estanho estão sendo muito estudados. Diversos compostos com diorganoestânicos de fórmula geral R_2SnL ($\text{R} = n\text{-Bu}$ e Ph e $\text{L} =$ alaninafenilalanina, fenilalanilaleucina, fenilalanina-fenilalanina, glicinalleucina e glicinaisoleucina) tem apresentado propriedades farmacológicas (NATH M. et al; 1999).

Os produtos obtidos em cada reação foram caracterizados e submetidos a testes biológicos sendo suas propriedades farmacêuticas e toxicológicas avaliadas.

A toxicologia é o estudo dos efeitos adversos de substâncias químicas sobre organismos vivos.

A toxicologia cumulativa é o efeito nefasto de doses repetidas, resultantes da ação prolongada, ou do aumento da concentração da substância administrada, ou de seus metabólitos sobre os tecidos sensíveis. No protocolo experimental são abordadas várias dosagens bioquímicas para se avaliar estes efeitos.

A avaliação do efeito destas substâncias foi efetuado a partir das dosagens além de colesterol-total, triacilgliceróis, colesterol-HDL e colesterol-LDL, uréia, ácido úrico, glicose, proteínas-totais, albumina, bilirrubina total, fósforo, cálcio, gama glutamil transferase (Gama-GT) e as enzimas transaminase glutâmico-piruvica (TGP) e transaminase glutâmico oxaloacética (TGO).

Estes constituintes revelam resultados cuja interpretação vai indicar se o organismo do animal está sofrendo algum tipo de distúrbio ao serem ingeridas as substâncias-testes.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Flavonóides

Os flavonóides são compostos polifenólicos pertencentes a um amplo grupo de metabólitos secundários que derivam de rotas biossintéticas provenientes de subunidades do acetato e do chiquimato, classificados como composto de função mista. São responsáveis pela cor das flores e por grande parte do “flavour” de alimentos e bebidas derivadas geralmente de plantas superiores, onde principalmente ocorrem (MANN, J. et al., 1986).

A quantidade dos flavonóides nas plantas superiores varia de acordo com o período de crescimento e maturidade na qual estas se encontram. Apenas uma pequena quantidade de espécies tem sido sistematicamente examinada no que se diz respeito ao conteúdo de flavonóides bem como todos os tipos presentes no consumo humano. Nas plantas, a produção de flavonóides tem como finalidade à proteção contra parasitas fúngicos, herbívoros, patogênicos e lesões oxidativas celulares, bem como também auxiliam na polimerização e na orientação de insetos a sua fonte de alimento. Por exemplo antocianinas produzem pigmento rosa, vermelho, violeta e azul para a cor de flores (COOK e SAMMAN, 1996).

O esqueleto C_{15} dos flavonóides é invariavelmente presente. Este é biogeneticamente derivado de fenilpropano (C_6-C_3) que tem como precursor o ácido chiquimico e três unidades acetato (C_6). Do ponto de vista químico eles podem ser considerados como derivados de 2-benzopirano (YOKOZAWA et. al., 1997).

A figura 1 representa a estrutura básica das flavonas.

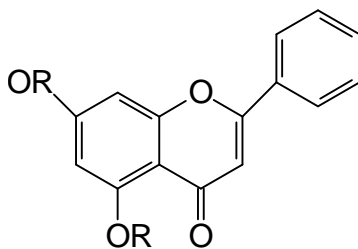


Figura 1-Estrutura básica das flavonas

Os flavonóides são classificados de acordo com sua estrutura química. Mais de quatro mil diferentes flavonóides foram identificados dentro de suas classes: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, diidroflavonóis e chalconas. Flavanonas ocorrem predominantemente em frutas cítricas, flavonas em ervas, isoflavonóides em legumes, antocianinas e catequinas em frutas e flavonóis em todas as frutas e vegetais (COOK e SAMMAN, 1996; PETERSON e DWYER, 1998).

As várias classes de flavonóides existentes diferem-se entre si de acordo com o nível de oxidação do anel pirano central, exceto nas chalconas que possuem estrutura aberta. Cada classe de flavonóide pode apresentar modificações, como hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, ou ramnosilação, resultando numa enorme diversidade de flavonóides na natureza (COOK e SAMMAN, 1996).

Os mais abundantes pigmentos que existem nos vegetais com a estrutura da fenilbenzopirona são as flavanonas e os flavonóis. A significância desses pigmentos com relação à cor dos vegetais se limita aos vegetais amarelados. A distinção entre as flavonas e flavonóis é muito pequena, flavonóis apresentam-se hidroxilados na posição 3. Pertencentes ao grupo das flavonas apenas a luteonina, apigenina e tricetina são comuns a natureza das quais se derivam estruturas de outras agliconas. Os flavonóis mais comuns são o kaemferol, a quercetina e a miricetina, e entre eles o mais importante é sem dúvida a rutina (3-rutinosil-quercetina), que possui sua atividade biológica confirmada em diversos trabalhos já publicados (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

Inicialmente, os flavonóides foram utilizados como tintas naturais. Atualmente os flavonóides são uma vasta fonte de pesquisa no que se diz respeito à suas possíveis propriedades farmacológicas, podendo assim num futuro bem próximo, serem utilizados como fármacos no controle de diversas patologias e desordens metabólicas, tendo como exemplo as doenças cardiovasculares (OKUDA, 1992).

2.1.1. Fonte e consumo de flavonóides

Os flavonóides são substâncias naturais. De forma geral estes estão presentes em frutos, flores, sementes, nozes, etc. Dentre os alimentos ricos em flavonóides consumidos pelo homem encontram-se soja, maçã, uva, cebola, repolho, brócolis, chicória, aipo, chá e vinho tinto. Por estarem presentes em diversas fontes alimentícias, os flavonóides são incorporados sem maiores dificuldades à dieta humana. Esses compostos são absorvidos no trato gastrointestinal de homens e animais e são excretados intactos ou como metabólitos na urina e fezes (COOK e SAMMAN, 1996, BATLOUNI, 1997).

Dietas que relatam quantidades de flavonóides são insuficientemente documentadas. Publicou-se um trabalho feito na Holanda que quantificava apenas cinco compostos (Apigenina, kaemferol, luteolina, miricetina e quercetina) de duas classes de flavonóides (flavonas e flavonois). Todos os outros flavonóides foram ignorados ou estimados, do que medidos realmente. De acordo com este estudo a quantidade de flavonóides na dieta é de 23 mg por dia (expressada como aglicones). Lembrando-se que este trabalho se baseou em alimentos comumente consumidos na Holanda e, portanto, não representou adequadamente o conteúdo de flavonóides consumidos em outros países. Em uma outra revisão de 1976 incluindo as 5 classes de flavonóides estimou-se a quantidade de 1 g por dia, porem seus métodos analíticos não se apresentavam muito precisos (PETERSON et al., 1998).

Alguns alimentos apresentam-se como fonte de um ou mais flavonóides específicos. A quercetina e a antocianina são encontradas em maior quantidade em frutas (como a cereja, amora, uva, morango, jabuticaba), nos grãos, em tomate, batata, berinjela, feijão marrom e cebola. A quercetina é a mais consumida na dieta (16 mg/dia), o kaempferol (4 mg/dia), miricetina (1,4 mg/dia). O vinho tinto também possui altos níveis de flavonóides, aproximadamente 22,5 mg/L (3,8 mg/170 mL). Sistemáticamente deve-se efetuar uma análise do conteúdo de flavonóides em alimentos consumidos em específico em outros países para assim avaliar a quantidade real consumida destas substâncias por outras populações (COOK e SAMMAN, 1996).

2.1.2. Atividades biológicas e propriedades farmacológicas dos flavonóides

Atualmente diversos estudos estão sendo efetuados visando a confirmação de propriedades farmacológicas de flavonóides bem como seus aspectos toxicológicos. Ensaio biológicos *in vitro* utilizando-se flavonóides possibilitaram a confirmação de um grande número de atividades biológicas demonstrando assim a grande potencialidade destes compostos fenólicos naturais.

Inicialmente os flavonóides eram considerados compostos que apresentavam atividade vitamínica. Entretanto à medida que lhe eram atribuídos diversos outros efeitos biológicos a definição de vitamina tornou-se incorreta, uma vez que uma vitamina pode ser definida como um nutriente essencial e indispensável cuja carência provoca síndromes de deficiência que podem ser supridas pela administração da substância em questão. Conseqüentemente o Comitê conjunto de Nomenclatura em Bioquímica da American Society of Biological Chemists e o American Intitute of Nutrition recomendaram em 1950 o uso do termo menos restritivo de “Bioflavonóides” para incluir assim esta classe de substância que apresentavam alguma forma de atividade biológica. Em frutos cítricos uma série de flavonóides, apresenta clara evidência científica de que estes compostos possuem propriedades antioxidantes com efeitos sinérgicos e de proteção sobre a vitamina C (BORREGO, 1995).

Posteriormente, o uso isolado de flavonóides em ensaios biológicos revelou diversas outras propriedades destes compostos. Atividade antimicrobiana, antiulcerogênica, citotóxica, antineoplásica, antimutagênica, antioxidante, antihepatóxica, antihipertensiva, hipolipodêmica, antiplaquetária e antiinflamatória foram observadas em diversos estudos (WILLIAN et al., 1995).

Flavonóides metilados como 6,8-dimetilquercetina 3-metil éter, 6-C metilquercetina 3,7- dimetil éter, 6,8-di-C-metilquercetina 3,7 dimetileter, 6,8-di-C-metilKaemferol 3 metil éter e 6,8-di-Cmetilkaenferol 3,7-dimetil éter isolados de folhas de *Piliostigma thonningii*, e testadas na inibição de síntese de protanglandinas *in vitro* e em relação a sua atividade antibacteriana contra *Staph. Aureus* (microorganismo resistente a vários antibióticos e responsáveis

por infecções hospitalares). Observando que estes flavonóides metilados apresentam atividade potencializada quanto ao seu grupo metila. Extratos de folhas desta planta tropical africana já era utilizada no tratamento de diversas infecções, febres e condições inflamatórias (IBEWUIKE et al., 1997).

Flavonóides apresentam atividade antioxidante e antialérgica. A quercetina: inibe a liberação de histamina induzida na presença de um antígeno. Deve-se destacar que esta propriedade não está apenas ligada à sua estrutura química como também a sua capacidade de responder a um determinado estímulo. Alguns flavonóides são ativos a determinados estímulos e inativos frente a outros.

Extratos metanólicos de raízes de *Scutellaria baicalensis* apresentaram ação antiinflamatória na ativação dos fibroblastos gengivais. Esta ação consiste na ativação celular, aumentando assim a síntese de colágeno e proteína total nos fibroblastos, em contraste para aos crescentes fatores que aumentam apenas a síntese de proteína total. Assim a presença de flavonóides presentes neste extrato pode bloquear o principal processo inflamatório de destruição do tecido periodontal e aumentar a atividade celular dos fibroblastos ocasionando a regeneração mais rápida do tecido lesado inibindo a atividade da collagenase. (CHUNG et al, 1994)

Ao conjunto de propriedades farmacêuticas dos flavonóides também são relatados seus efeitos contra diabetes mellitus, ulcera duodenal e estomacal e infecções virais. O mecanismo molecular que lhe atribuem estes efeitos, a cada dia se torna mais estudado e compreendido, e vão sendo apresentadas diversas explicações para sua forma de ação. É conhecido que estes podem se ligar a polímeros biológicos como as enzimas, hormônios e até mesmo ao Ácido desoxiribonucleico, o DNA. A formação de quelatos com metais, como por exemplo o Fe^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} e Mg^{+2} , catalisa o transporte eletrônico e esta envolvido nos processos de antioxição na presença de radicais livres (SASKIA et al., 1998).

O efeito benéfico sobre o sistema circulatório, é uma de suas propriedades farmacológicas mais estudadas na atualidade. O efeito dos flavonóides sobre a parede vascular ligava-se a atividade vitamínica, porém determinou-se em estudos posteriores que os flavonóides apresentavam um efeito “antiadesivo” sobre os fenômenos de agregação plaquetária.

De modo geral, alguns flavonóides exercem efeitos mediante a modificação da permeabilidade vascular, modificando algumas enzimas (inibição) que estão envolvidas no processo de coagulação sanguínea, fibrinogênese, modificações das propriedades do fluxo sanguíneo bem como vão influenciar em alguns dos eventos envolvidos nos processos de aterosclerose e trombose. A propriedade de captação de radicais livres dos flavonóides pode proteger as fibras de colágeno da degradação por ânions superóxidos. Alguns flavonóides podem ativar as fibras de colágeno e a reticulação das fibrilas (CHUNG, et al.; 1994)

Estudos epidemiológicos, onde dietas em alimentos ricos em flavonóides foram utilizadas, revelaram a correlação com o aumento da longevidade e diminuição da incidência de doenças cardiovasculares observadas nas populações da França. O flavonóide mais freqüentemente estudado, a quercetina, mostrou ter propriedades biológicas consistentes com seu efeito poupador do sistema cardiovascular. Flavonóides têm mostrado modificar biossíntese de eicosanóides (resposta antiprostanóide e antiinflamatória), proteger oxidação de LDL (previne formação de placa aterosclerótica), prevenir agregação plaquetária (efeitos antitrombóticos), e promover relaxamento de músculo liso (efeito antihipertensivo e antiarrítmico). Em adição, flavonóides tem mostrado possuir propriedades antiviral e carcinostático. A atividade dos flavonóides como inibidores da transcriptase reversa sugerem um lugar desses compostos no controle de infecções por retrovírus, como na síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) (FORMICA, 1995).

Experimentos realizados por SUDHEESH et al. (1997) mostraram que ratos Sprague-Dawley machos alimentados com uma dieta padrão contendo flavonóides (1mg/100g por 45 dias) apresentaram diminuição significativa da concentração de colesterol no fígado, triacilgliceróis no soro e fígado, fosfolipídios do soro e fígado, ácidos graxos livres no fígado, aorta e coração. Num segundo experimento, os animais foram alimentados com dietas livres de colesterol e dieta contendo colesterol (2g/100g de dieta) suplementadas com flavonóides (1mg/100g por 90 dias). Neste experimento, foi observado que com a suplementação com flavonóides ocorreu uma diminuição significativa do colesterol no soro, fígado, coração e rim, triacilgliceróis no soro, fosfolipídeos de fígado e rim e ácidos graxos no fígado e soro. A atividade de Beta-hidroxi-

beta-metilglutaril CoA sintetase, glicose-6-fosfato desidrogenase (somente no experimento 1) e malato desidrogenase (experimento 1 e 2) diminuíram significativamente pela suplementação com flavonóides. A atividade de lipase e lecitina colesterol aciltransferase do plasma foram significativamente aumentadas em ambos experimentos pela suplementação com flavonóides. Além disso, níveis de ácidos biliares hepáticos e fecais e esteróis neutros fecais aumentaram significativamente pela suplementação, indicando um alto padrão de metabolismo de colesterol.

Investigações bioquímicas dos mecanismos da ação dos flavonóides tem mostrado que estes compostos inibem uma ampla variedade de sistemas enzimáticos. A capacidade de certos flavonóides para inibir tanto a ciclooxigenase quanto a 5-lipoxigenase no metabolismo do araquidonato pode contribuir para propriedades antiinflamatórias. Também foi mostrado que eles aumentam a permeabilidade capilar e exercem um efeito inibitório na exsudação de proteínas e migração de leucócitos. Em outras palavras, flavonóides são conhecidos por mostrar propriedades antioxidantes, incluindo eliminação de radicais livres e prevenindo peroxidação de lipídeos (PELZER et al, 1998).

A propriedade antioxidante, e, especialmente a capacidade de afetar fosforilação de proteína celular, e o efeito inibitório desses compostos sobre plaquetas e leucócitos bem como seu efeito protetor sobre células endoteliais sugere que eles são de potencial interesse na inibição da coagulação sanguínea e na antiagregação plaquetária (LALE et al., 1996).

Esta ação de proteção a eventos cardiovasculares está intimamente ligada a sua atividade antioxidante. Sabe-se, hoje em dia, que a produção excessiva de radicais livres e a peroxidação de lipídios podem estar relacionados ao desenvolvimento de várias enfermidades crônicas como a aterogênese e o câncer. Os compostos antioxidantes podem exercer efeitos protetores mediante a inibição das reações de oxidação, como o tocoferol, ácido ascórbico e os flavonóides que seriam provavelmente o grupo de antioxidantes presentes em nossa alimentação mais comuns e ativos (em sistemas hidrofílicos como lipofílicos). Em sistemas vivos formam-se radicais livres a partir da reação com oxigênio formando peróxidos e hidroperóxidos. Estes compostos podem sofrer reações em cadeia contribuindo assim na

aceleração de enfermidades, como por exemplo, naqueles processos que podem causar danos à parede vascular dos vasos sanguíneos, conduzindo a aterogênese e ainda podem acelerar uma série de eventos que vão originar a trombose. O mecanismo de atividade antioxidante dos flavonóides parece se apresentar de duas maneiras. Por um lado atuam como captadores de radicais livres e por outro lado tem a capacidade de quelar íons metálicos reduzindo a peroxidação induzida por metais que podem estar presentes em algumas enzimas como cofatores (BORREGO, 1995).

2.2. Efeitos farmacológicos de Rutina e suas propriedades:

A rutina, flavonóide utilizado em nosso estudo, pertence a classe das flavonas que sofreu posterior glicosilação, sendo incorporada assim um grupo rutinose a sua estrutura inicial (MANN, J.; 1986).

Sua nomenclatura oficial é 3-[[6-O-6(-deoxi- α -L-manopiranosil)- β -D-glicopiranosil]oxi]-2-(3,4-didroxifenil)-6,7-dihidroxi-4H-1benzopira-4-ona. Podendo ser chamada de rutosídeo, quercetina-3rutinosídeo e 3,3',4',5,7-pentahidroxi-3-rutinosídeo. Sua composição química restringe-se aos elementos carbono oxigênio e hidrogênio possuindo a fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{16}$.

Na Química de coordenação este flavonóide classifica-se como um ligante polidentado e o estudo dos modos de coordenação deste ligante a metais de transição e organoestânicos causa interesse pelo seu caráter polibásico e ambidentado. Suas propriedades farmacológicas são descritas demasiadamente, e diversos ensaios biológicos, incluindo este composto, já foram relatados.

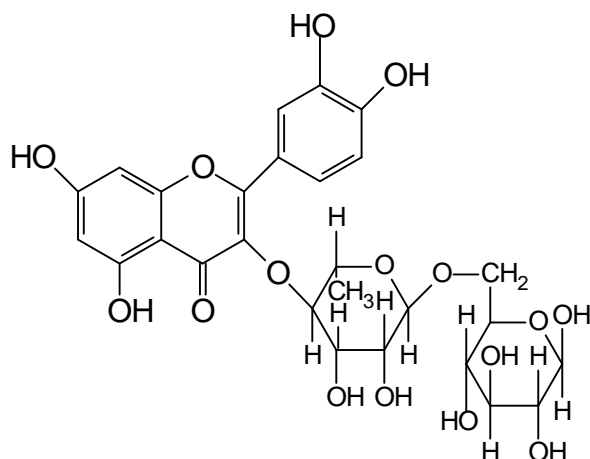


Figura 3- Estrutura da rutina

A rutina teve sua capacidade antioxidante comprovada em vários experimentos já realizados. Grinberg et al. 1994, descreve experimentos que confirmam efeitos de proteção contra a oxidação da hemoglobina na presença da Primaquina, uma droga prooxidante, antimalarial que eventualmente pode causar hemólise ao ser administrada em glóbulos vermelhos de humanos.

A potencialização de agentes antioxidantes como o ácido ascórbico (vitamina C) e tocoferol (vitamina D) foi descrita em recentes experimentos. Quando a vitamina D e Rutina são utilizadas em combinação, um efeito aditivo é observado, enquanto a associação do ácido ascórbico (vitamina C) e Rutina, geram um supra aditivo efeito (sinergismo). Uma tripla combinação entre estes antioxidantes em potencial apresenta um aumento na capacidade de captar radicais livres em soluções aquosas homogêneas e inibição da peroxidação de lipídios em eritrócitos uma vez que a Rutina promove interações eficientes com o α -Tocoferol (vitamina D) na superfície e interfase das membranas e simultaneamente estabelece interações satisfatórias com o Ácido Ascórbico (vitamina C) em soluções aquosas. Assim a adição deste flavonóide a este sistema promove uma associação muito eficaz das propriedades antioxidante destas substâncias sendo a rutina o agente de ligação do complexo antioxidante potencializado (SALVAYRE et al., 1991).

Testes com Radicais livres derivados do óxido nítrico foram efetuados com muito sucesso. Radicais com estas características; estão envolvidos em diversos processos patológicos, como os tipos inflamações e lesões do tecido

endotelial, e apresentam grande grau de toxicidade em veias e artérias. Os radicais difundem-se nas células musculares vasculares do tecido liso onde induzem a formação cGMP que esta relacionado com o processo de relaxamento muscular, conduzindo a vasoconstrição e possivelmente a lesões celulares. O flavonóide Rutina, em particular, apresentou-se muito eficaz na captação desta classe de radicais. (SASKIA et al., 1995).

Estudos do efeito da quelação na atividade antioxidante dos flavonóides revelaram que este processo é mais importante para Rutina do que para a Quercetina (Rutina não glicosilada). A Rutina é muito menos lipofílica que a quercetina e isto influencia a sua permeabilidade pela membrana celular (SASKIA et al., 1998).

O efeito cardioprotetor da rutina na captação de radicais livres foi também relatado por experimentos com a Doxorubicina, um medicamento antineoplástico de grande ação farmacológica administrado no tratamento de *hematogênicos malignus* como tumores de garganta, seio, tireóide e ovário e que contrariamente possui efeitos colaterais desagradáveis gerando cardiomiopatias de sério comprometimento (SANDEEP et al., 1995).

2.3. Organoestânicos e suas propriedades biológicas

O desenvolvimento crescente da química organoestânica pode ser atribuído principalmente à importância tecnológica dos compostos organometálicos do estanho, os quais podem ser sintetizados como agente biocidas, pesticidas catalisadores de diversas reações e mais recentemente como agentes antitumorais (LIMA, G. M.;1999).

A utilização de derivados inorgânicos estânicos, como fluoreto de estanho (II), já é relatada em fórmulas de pastas de dentes, soluções típicas, e outras atributos dentários, bem como pode-se observar a presença de derivados estânicos em formulações farmacêuticas que visam o tratamento da pele, contra problemas como acne, espinhas. Experimentos utilizando ratos

relataram que o uso de cloreto de estanho (II) origina um composto promissor no tratamento preventivo da hipertensão (CROWE, A.; 1994).

Novos complexos diorganoestânicos de fórmula geral R_2SnL ($R=n$ -Bu e Ph e L = alaninafenilalanina, fenilalanilaleucina, fenilalaninafenilalanina, glicinalleucina e glicinaisoleucina) foram sintetizados e caracterizados por métodos como análise elementar, condutância molar, RMN ^{13}C $\{^1H\}$ e RMN ^{119}Sn . Estes compostos foram testados utilizando-se diferentes bactérias (*Escherichia coli*, *Rhizobium melioli*, *Pseudomonas putida* e *Aeromonas formicans*) e fungos (*Apergillus niger*, *Pencillium Chrysogenum*, *Aureobasidium pullulans* e *Verticillium dahliae*) com relatada atividade. A DL_{50} (dose letal) valores ($> 500 \text{ mg Kg}^{-1}$) foi determinado com ratos albinos. A atividade anti-inflamatória (% inibição) destes compostos em ratos albinos adultos teve seu máximo de 20% inibição apresentando, em acréscimo, esta propriedade farmacológica (NATH M. et al; 1999).

Derivados antibióticos diorganoestânicos e triorganoestânicos (onde antibióticos são: amoxicilina, ampicilina, metilina e penicilina) apresentaram considerável atividade biológica in vivo. Diorganoestânicos derivados tanto de Cloranfenicol como de D-cycloserina foram incubados juntamente com ovos e embriões de *Ciona intestinalis* e *Ascidia malaca* para que fosse avaliado seu estudo citotóxico in vivo. A deficiência no crescimento destes organismos foi observada já nas concentrações de $10^{-4} \text{ mol/dm}^{-3}$ destes compostos (PELLERITO A., 1998).

É importante a ação de organoestânicos como agentes antibacterianos uma vez que bactérias como a *Clamydia* são responsáveis por infecções nas artérias sanguíneas, levando também a aterosclerose. As bactérias e seus produtos, possivelmente estão envolvidos na endocardite infecciosa, doença cardíaca congênita, ativação plaquetária. Os flavonóides parecem inibir o crescimento e replicação de bactérias que são patogênicas ao sistema vascular de humanos. O crescimento e replicação de muitas espécies de *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Cândida* podem ser inibidos por uma variedade de flavonóides. O efeito bactericida pode ser devido a danos induzidos por flavonóides ao DNA bacteriano (SCHRAMM E GERMAN, 1998). A complexação do flavonóide rutina com organoestânicos pode promover o aumento destas propriedades farmacológicas.

2.4. Metabolismo Lipídico

2.4.1. Lipídios

O termo geral lipídeos abrange um grupo de moléculas que tem como principal característica a insolubilidade em água, que apresentam-se como um grupo heterogêneo de componentes incluindo óleos, gorduras, ceras, e componentes correlatos, encontrados em alimentos e no organismo humano.

Este grupo de compostos estão envolvidos em diversas funções biológicas. Gorduras e óleos são a principal forma de armazenamento de energia de muitos organismos sendo os lipídeos os constituintes de 50% das membranas celulares. Outros lipídeos, embora estejam presentes em pequenas quantidades são constituintes de cofatores de muitas enzimas, pigmentos, agentes emulsificantes, “transportadores” de vitaminas lipossolúveis, hormônios e mensageiros intracelulares (KRAUSE E MAHAN, 1995).

2.4.2. Ácidos Graxos Livres

Os ácidos graxos livres (FFA, ácidos não esterificados) aparecem no plasma devido à lipólise dos triacilgliceróis no tecido adiposo ou como resultado da ação da lipase durante a incorporação dos triacilgliceróis plasmáticos aos tecidos. Eles são encontrados em combinação com soro albumina em concentrações que variam entre 0,1 a 2 eq/mL de plasma e compreende os ácidos graxos de cadeia longa encontrados no tecido adiposo; como palmítico, esteárico, oléico, palmitoleíco, etc...

Foram descritos na albumina pontos de ligação com afinidades variáveis para ácidos graxos. Níveis baixos de ácidos graxos livres são detectados no estado bem alimentado, alcançando aproximadamente 0,5 eq/mL no período de pós-absorção e entre 0,7 a 0,8 eq/mL no estado de jejum completo. No diabetes melitus, não controlado, o nível pode atingir até 2 eq/mL. O nível cai justamente após a alimentação e sobe novamente antes da refeição seguinte; entretanto nos animais que se alimentam continuamente, como ocorre nos

ruminantes, nos quais ocorre entrada constante de nutrientes a partir do intestino – os ácidos graxos livres permanecem em nível baixo (KRAUSE e MAHAN, 1995, HAPER, 1994).

A velocidade de remoção dos ácidos graxos do sangue é extremamente alta. Parte do que foi retirado é oxidado e responde por cerca de 25-30% da energia necessária ao estado de jejum. O restante do que foi retirado é esterificado. Na inanição, o quociente respiratório (QR) indica que consideravelmente a gordura do tecido adiposo. Esta diferença pode ocorrer pela oxidação de lipídios esterificados da circulação ou daqueles presentes nos tecidos. Acredita-se que estes últimos ocorram particularmente no coração e músculo esquelético onde se encontram depósitos consideráveis de lipídios nas células musculares.

A presença de uma proteína ligante de ácidos graxos ou proteína Z, foi relatada no citosol dos principais tecidos. Admite-se que a função desta proteína no transporte intracelular é semelhante à função da albumina sérica no transporte extracelular dos ácidos graxos de cadeia longa. (HAPPER, 1994)

2.4.3. Triacilgliceróis

Denominados também como triacilgliceróis (TAG), estes são ésteres de glicerol com ácidos graxos. O glicerol pode ser esterificado por uma, duas ou três moléculas de ácidos graxos. Geralmente os triglicerídios são formados por três ácidos graxos diferentes entre si. As propriedades químicas e físicas do TAG são determinadas de acordo com os ácidos graxos que os compõem.

Nas células eucarióticas os triacilgliceróis têm como a principal função a de combustível devido sua alta densidade energética e baixa solubilidade, tendo também a função de isolante térmico. Células especializadas de animais vertebrados denominados adipócitos são uma enorme fonte de armazenamento de triacilgliceróis. Até dois terços da energia total das células, podem ser supridos nesta forma. Devido apresentarem um número maior de carbonos mais reduzidos do que os açúcares, este processo se torna mais vantajoso a partir dos triglicerídios do que com os carboidratos, apesar dos carboidratos apresentarem um metabolismo mais rápido do que os

triacilgliceróis devido a sua maior solubilidade em água (KRAUSE e MAHAN, 1995 e HAPER, 1994).

2.4.4 - Colesterol

O colesterol é o componente essencial das membranas estruturais de todas as células. É encontrado em altas concentrações nos tecidos glandulares e fígado. Os principais órgãos responsáveis pela produção de colesterol são o fígado e o intestino, que produzem em torno de 25% do colesterol endógeno. É um intermediário chave na biossíntese de uma série de esteróides importantes incluindo os ácidos biliares, hormônios adrenocorticais, estrógenos, andrógenos e progesterona. O colesterol é encontrado apenas em alimentos animais. A sua relação com gorduras e alimentos associa-se a aterosclerose (KRAUSE e MAHAN, 1995)

O colesterol do organismo humano pode ser obtido através dos alimentos ou por síntese endógena. Um indivíduo adulto saudável excreta cerca de 1g de derivados de colesterol por dia, metade dos quais são repostos pela dieta e metade por biossíntese.

A síntese do colesterol inicia-se com a condensação de duas moléculas de acetil-CoA provenientes do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, produzindo acetoacetil-CoA. Na etapa seguinte ocorre a condensação com uma terceira molécula de acetil-CoA, produzindo 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). As enzimas que catalisam estas reações são, respectivamente, tiolase e hidroximetilglutaril-CoA sintase (HMG-CoA sintase), ambas citossólicas. Nos hepatócitos, essas duas enzimas são encontradas também nas mitocôndrias, e a HMG-CoA formada é precursora dos corpos cetônicos. A HMG-CoA é a seguir reduzida a mevalonato, numa reação catalisada pela HMG-CoA redutase, uma enzima ligada ao retículo endoplasmático. Esta é a etapa limitante da síntese de colesterol: a atividade e a síntese da HMG-CoA redutase são controladas por vários fatores (MARZZOCO et al., 1999).

O mevalonato a partir de uma série de reações de condensação origina o esqualeno que será o precursor do colesterol a partir da síntese do lanosterol (ATKINS, 1995).

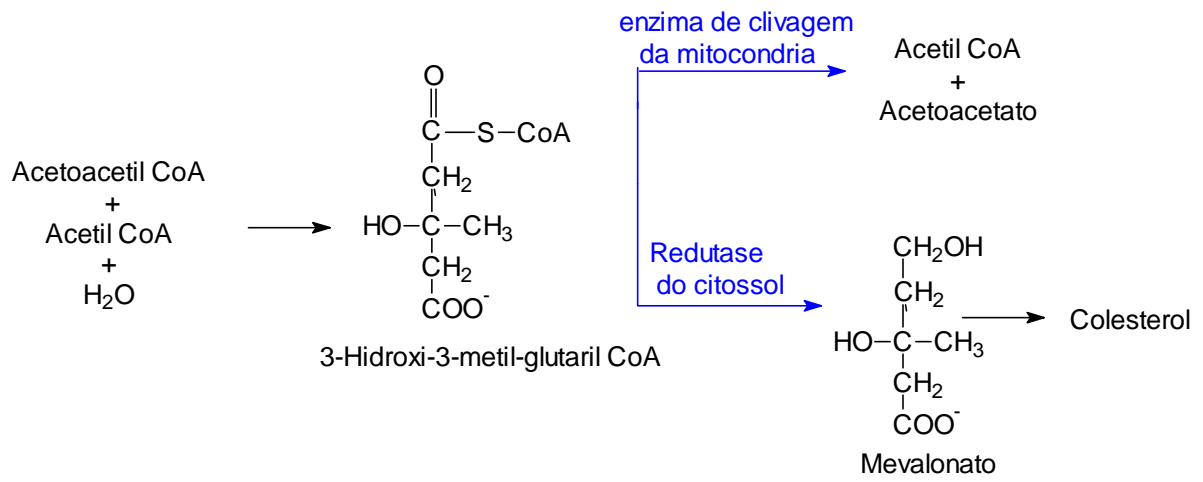
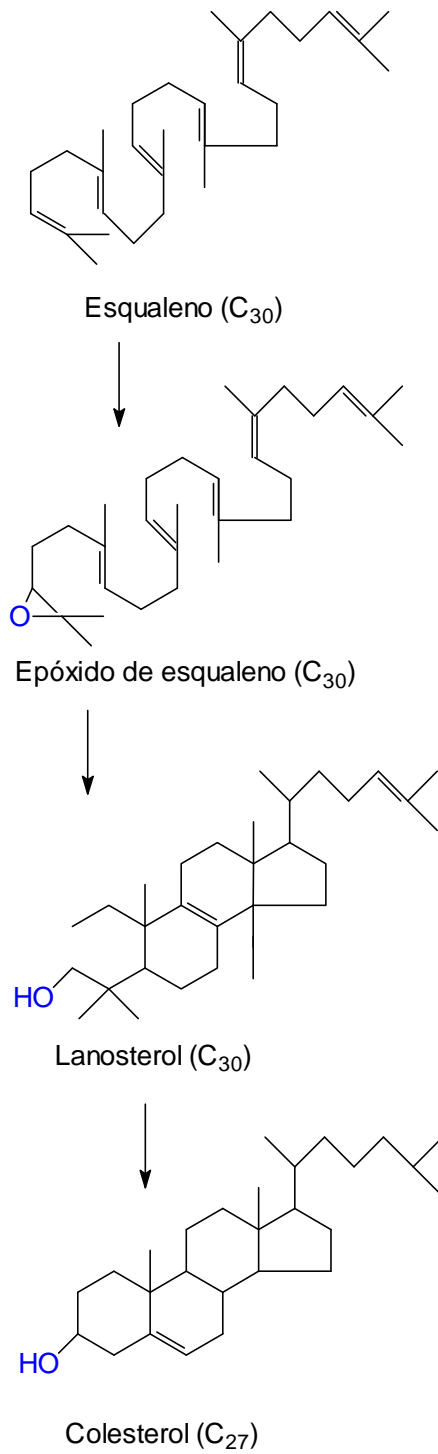


Figura 4- Síntese e destinos da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA



Fonte:STRYER, 1996

Figura 5 -Síntese do colesterol a partir do esqualeno

2.4.5. Digestão e absorção de Lipídios

A digestão de lipídios inicia-se no estômago sob a ação da lipase gástrica, que hidrolisa triglicerídios de cadeia curta em ácidos graxos e glicerol. A ação peristáltica do intestino delgado quebra os glóbulos maiores de gordura em partículas menores, denominadas micelas que facilitam a passagem dos lipídios através do meio aquoso do lúmen intestinal para a borda da escova (estrutura microvilar presente nas células da parede da luz intestinal). A ação emulsificante da Bile os conserva separados, facilitando a digestão pela lipase pancreática. Observa-se a presença de uma proteína denominada colipase que mantém mais unida as lípases às micelas formadas. A *bile* é uma secreção do fígado, composta de ácidos biliares (ácido glicocólico e taurocólico), pigmentos biliares, sais inorgânicos, alguma proteína, colesterol, lecitina, e muitos outros componentes metabolizados e secretados pelo fígado, como drogas detoxicadas. Os sais biliares são assim liberados de seus componentes lipídicos e retornam ao lúmen intestinal (não permanecendo nas células). A maioria dos sais biliares é ativamente reabsorvida no íleo terminal e é reciclada de volta ao fígado para entrar no intestino através da vesícula biliar. Essa eficiente reciclagem é conhecida como circulação *êntero hepática*. O “pool” de ácidos graxos pode circular de 3 à 15 vezes ao dia, dependendo da quantidade de alimento ingerido (HAPER 1994).

Devido sua extensão ser mais curta e, portanto, aumento na solubilidade, os ácidos graxos de cadeia menor e igual 10 carbonos podem ser absorvidos diretamente nas células mucosas sem a presença da bile e formação das micelas. Após esta etapa na mucosa celular, irão diretamente sem esterificação para a veia porta, através da qual serão carregadas para o fígado.

Nas células mucosas, os ácidos graxos e monoglicerídios, produzidos por esta etapa do processo digestivo, são reunidos em novos triglicerídios. Poucos são digeridos em glicerol e ácidos graxos livres e então reunidos para formar triglicerídios. Estes triglicerídios junto com colesterol e fosfolipídios são circundados por uma -lipoproteína formando os quilomícrons. Os glóbulos passam para os canais lácteos dos vilos por um processo de exocitose.

Os quilomícrons são transportados pelos vasos linfáticos para o ducto torácico e esvaziado na corrente sanguínea na junção das veias jugular interna esquerda e subclávia esquerda. Os quilomícrons são então carregados para o fígado, onde os triglicerídios são reagrupados em lipoproteínas e transportados para o tecido adiposo para metabolismo e armazenamento (KRAUSE e MAHAN 1995).

O colesterol é absorvido de maneira similar após ser hidrolisado de sua forma de éster, através da enzima colesterol esterase pancreática. As vitaminas lipossolúveis A, D, E e K também são absorvidas de quadro micelar, embora algumas formas de vitamina A, E, K e carotenos possam ser absorvidos na ausência de sais biliares.

Informação sobre os pontos específicos da digestão dos lipídios no coelho encontra-se de modo escasso. Provavelmente tem lugar fundamental no intestino delgado, onde se agregam a lipase e a bile. Os ácidos graxos insaturados consumidos pelos ruminantes, animais de metabolismo bem semelhante aos coelhos, se hidrogenam no rúmen, convertendo-se em ácidos graxos saturados, fator este que determina o alto teor destes ácidos na carne destes animais. Não se sabe se esta hidrogenação tem lugar no intestino grosso do coelho, mas, como a absorção se realiza no intestino delgado, é pouco provável que se produza uma hidrogenação apreciável de gorduras insaturadas no coelho.

Os ácidos graxos essenciais como o ácido linoléico, linolênico e araquidônico, funcionam como componentes das membranas celulares e como precursores da prostaglandina. A partir de ácidos como linoléico podem ser sintetizados os outros ácidos, sendo este classificado como um ácido essencial primário. Deficiência de ácidos graxos essenciais no metabolismo de coelhos podem evidenciar sintomas como dermatites e crescimento lento destes animais (CHEEKE, 1995).

Os coelhos possuem entre 40-50% de lipídios subcutâneos em relação aos lipídios totais presente em sua carne. O conteúdo de lipídios intramusculares e peritoneais revelam uma variação diretamente proporcional a sua idade (CHEEKE, 1995).

Diversos estudos têm sido efetuados revelando assim um notável interesse no conteúdo de colesterol presente na carne de coelho, uma vez que

teêm sido encontrado índices inferiores, deste constituinte em comparação as outras carnes consumidas de forma mais abrangente atualmente. As inter-relações entre o conteúdo de colesterol-total, ácidos graxos saturados e polinsaturados bem como seu valor energético, sugere-se que o efeito real da carne de coelho sobre a colesterolemia no homem pode ser menor do que para as carnes de soja, e comparada às de frango e peru (RAO et al, 1979; BEYMAN, 1984).

2.5. Transporte dos lipídios

2.5.1. Lipoproteínas; função e papel metabólico

Lipoproteínas são moléculas lipoprotéicas formadas por uma combinação de lipídios e proteínas transportadoras específicas, denominadas apolipoproteínas, com combinações variadas de fosfolipídios, colesterol e triacilgliceróis. Diferentes combinações de lipídios e proteínas produzem moléculas com diferentes densidades (MONTEIRO e ROSADO 1993).

A presença das moléculas protéicas vai atribuir maior solubilidade ao "complexo" formado possibilitando o transporte de lipídios no sangue.

O colesterol e os ésteres de colesterol, triacilgliceróis e fosfolipídios apresentam-se quase em totalidade insolúveis em água. As lipoproteínas plasmáticas possibilitam o transporte destes lipídios provenientes dos tecidos de sua origem como o fígado e onde são absorvidos como o intestino, pelo plasma sangüíneo, até os tecidos onde serão armazenados e metabolizados (MONTEIRO e ROSADO, 1993).

As principais são:

1-Quilomicrons: São partículas de maior diâmetro e densidade baixa

2-Lipoproteínas de alta densidade (High Density Lipoprotein)-HDL: São composta por um conjunto de proteínas plasmáticas, que contêm relativamente mais proteína e menos colesterol e triglicerídios, removendo o colesterol a partir da íntima.

3-Lipoproteínas de baixa densidade (Low density Lipoprotein)-LDL: Proteína plasmática que contém uma proporção maior de colesterol e triglicerídios e menos proteínas.

4-Lipoproteínas de densidade muito baixa (Very Low Density Lipoprotein)-VLDL: Proteína plasmática que contém relativamente mais triglicerídios do que colesterol. Transporta lipídios do fígado para os tecidos periféricos.

A extração de lipídios do plasma utilizando-se um solvente adequado, e subsequente separação do extrato em várias classes de lipídios mostraram a presença de triacilgliceróis, fosfolipídios, colesterol e ésteres de colesterol e, além disto, de uma pequena fração de ácidos graxos não esterificados de cadeia longa (ácidos graxos livres) que correspondem a 5% do total de ácido graxos presentes no plasma. Esta última fração, os ácidos graxos livres (FFA) são agora reconhecidos como metabolicamente a mais ativa dos lipídios plasmáticos (HAPER, 1994).

As várias classes químicas de lipídios ocorrem em quantidades variáveis na maioria das frações lipoprotéicas. Além das técnicas que dependem da densidade, as lipoproteínas podem ser separadas de acordo com suas propriedades eletroforéticas em , e pré- -lipoproteínas e podem ser identificadas mais precisamente, por meio de imunoelétroforese (HAPER, 1994).

O triacilglicerol é o lipídio predominante nos quilomícrons e VLDL enquanto que o colesterol e os fosfolipídios são os lipídios predominantes nas LDL e HDL, respectivamente.

2.5.1.1. Constituição das lipoproteínas

Uma proteína típica como os quilomícrons ou VLDL consiste de um cerne lipídico, constituído principalmente de triacilgliceróis e ésteres do colesterol, ambos apolares, circundados por uma única camada superficial de lipídios mais polares: fosfolipídios e ésteres de colesterol. Estas moléculas são orientadas de modo que seus grupos polares se dirijam para fora, ficando em contato com o meio aquoso da mesma forma que ocorre nas membranas celulares (HAPER 1994).

A parte protéica das lipoproteínas é conhecida como apolipoproteínas e constitui cerca de 60% do HDL e somente 1% dos quilomícrons. Algumas apolipoproteínas são integrais e não podem ser removidas enquanto outras estão livres para serem transferidas a outras lipoproteínas (CHEUNG et al.,1994).

As apolipoproteínas desempenham várias funções como: cofatores enzimáticos, proteínas transportadoras de lipídios bem como atuam como agentes ligantes para interação com outros receptores de lipoproteínas nos tecidos.

Uma ou mais apolipoproteínas estão presentes em cada lipoproteína. Designam-se as principais apolipoproteínas como as pertencentes ao HDL como A, LDL como B (também pode ser encontrada no VLDL e nos quilomícrons menores). As apolipoproteínas C podem ser transferidas livremente entre as lipoproteínas.

Os carboidratos podem até constituir 5% das apolipoproteínas e incluem manose, galactose, glicose glicosamina e ácido siálico. Assim, algumas lipoproteínas são também glicoproteínas. Muitas outras apolipoproteínas são encontradas entre as lipoproteínas plasmáticas. Uma delas é a apolipoproteína E rica em arginina, isolada a partir das VLDL e HDL; contém arginina na proporção de 10% do total de aminoácidos e representa 5-10% do total das apolipoproteínas dos indivíduos normais (HAPER, 1994).

2.5.1.2. Quilomícrons

Os quilomícrons são lipoproteínas sintetizadas no intestino. São as maiores lipoproteínas e as menos densas, contendo uma alta concentração de triacilgliceróis.

Os quilomícrons são sintetizados nas células entéricas movendo-se através do sistema linfático, entrando na corrente sanguínea, pela artéria subclávia, podendo receber diferentes apolipoproteínas (A, B, C, E). Devido ao seu tamanho os quilomícrons não conseguem entrar diretamente no sistema porta, pois não atravessam as membranas endoteliais dos capilares sanguíneos. Os quilomícrons são liberados das células intestinais por fusão dos vacúolos secretórios com a membrana celular (pinocitose reversa), passam aos espaços entre as células intestinais penetrando eventualmente no sistema

linfático que drena o intestino, porque além da glândula mamária, o intestino e o fígado são os únicos tecidos através dos quais é secretado lipídio na forma particulada. A incapacidade de um lipídio particulado do tamanho dos quilomícrons passar através das células endoteliais dos capilares sem hidrólise prévia é, possivelmente, a razão pela qual as gorduras dos alimentos entram na circulação através dos linfáticos e não pelo sistema porta do fígado (KRAUSE, 1995; HAPER, 1994).

Os quilomícrons são responsáveis pelo transporte na circulação de todos os lipídios da dieta. No quimo são encontradas partículas menores e mais densas que têm as características das VLDL. Todavia, a composição destas partículas assemelha-se mais aos quilomícrons do que as VLDL, indicando que elas podem ser consideradas como pequenos quilomícrons. Sua formação ocorre mesmo no jejum, sendo que seus lipídios originam-se principalmente das secreções biliares e intestinais. Por outro lado, a formação dos quilomícrons aumenta com a carga de triacilgliceróis absorvidos.

A remoção dos quilomícrons do sangue é rápida, sendo a meia vida da ordem de minutos, em pequenos animais, e mais prolongada, em animais maiores. As partículas maiores são catabolisadas mais rapidamente do que as menores. Quando, os quilomícrons marcados nos ácidos graxos dos triacilgliceróis são administrados intravenosamente, cerca de 80% da marcação é encontrada no tecido adiposo, coração e músculos e aproximadamente 20% fígado. Os experimentos com órgãos perfundidos têm mostrado que o fígado não metaboliza significativamente quilomícrons nativos e nem VLDL, a marcação no fígado deve resultar secundariamente dos tecidos extrahepáticos (HAPER, 1994).

2.5.1.3. Lipoproteína de muito baixa densidade- VLDL

A síntese da VLDL ocorre no intestino e no fígado. A maior parte das VLDL plasmáticas tem origem hepática. Cerca de 20% do total circulante de VLDL são proveniente do intestino e 80% do fígado. Estas são veículos do transporte de triacilgliceróis do fígado para os tecidos extrahepáticos.

Há muitas semelhanças entre os mecanismos de formação dos quilomícrons pelas células intestinais e das VLDL pelas células parênquima hepático. As VLDL são secretadas pelas células hepáticas parenquimatosas no espaço de Disse e então passa para os sinusóides hepáticos através da fresta em direção ao endotélio. Da mesma forma que os quilomícrons estes também entram na circulação através do sistema linfático. (KRAUSE, 1995; HAPER, 1994).

A VLDL, além do triacilglicerol presente na sua estrutura, apresenta pequenas quantidades de éster de colesterol bem como apolipoproteínas A, B e C. São estas lipoproteínas maiores que promovem o transporte de triacilgliceróis do fígado para tecidos extrahepáticos. Na circulação capilar, ocorrerá a ativação da lipase lipoprotéica pela apolipoproteína C, provocando a liberação de ácidos graxos livres dos triglicéridos das VLDL, dando origem às IDL- lipoproteínas de densidade intermediária. Essas partículas seguem dois caminhos: cerca de dois terços das IDLs podem ser captadas no fígado, pelos receptores de apo B/E e degradados em seus componentes. O terço restante sofre a ação da lipase hepática, fazendo que ocorra a perda dos triacilgliceróis e convertendo as IDLs em proteínas de baixa densidade que contém quase só ésteres de colesterol e colesterol, no seu núcleo, e apolipoproteína B na superfície (PLUMP et al., 1992).

Os ácidos graxos livres provenientes das partículas de VLDL são captados pelas células adiposas onde são resintetizados a triglicérides e são armazenados em gotículas lipídicas intracelulares.

2.5.1.4. Lipoproteínas de baixa densidade- LDL

As LDL são lipoproteínas que contém em maioria, ésteres de colesterol e colesterol no seu núcleo e na superfície apoB-100 como principal apolipoproteína. Essas lipoproteínas transportam o colesterol para os tecidos periféricos (extra-hepáticos) (FARMER e GOTTO, 1992).

Aparentemente a maior parte das LDL é formada a partir da VLDL, porém há evidências de alguma produção direta do fígado. A meia vida de desaparecimento da circulação da apoproteína B-100 da LDL é aproximadamente 36 horas. Estudos em cultura de fibroblastos, linfócitos, células do músculo liso da artéria e fígado mostraram a existência de sítios específicos de ligação ou receptores para as LDL, os receptores B-100. A partir desses receptores específicos, é promovida a captação do colesterol e dos ésteres de colesterol pelos tecidos periféricos (HAPER, 1994).

A ligação entre a lipoproteína LDL à estes receptores de alta afinidade promove o processo de endocitose e assim a digestão pelos lisossomas no interior das células. A fusão da membrana da vesícula com a membrana lisossomial expõe a LDL a enzimas hidrolíticas que degradam apoB em aminoácidos. Os ésteres de colesterol são hidrolisados por colesterol esterase, e o colesterol liberado deixa os lisossomos para ser usado nas reações celulares (PETERSDORF et al., 1984; GOLDBERG, et. al.,1985).

A existência de níveis plasmáticos altos de LDL dá origem à mecanismos menos eficientes de remoção. Um destes exemplos ocorrem nas células de limpeza ou macrófagos do sistema retículo endotelial. Quando os níveis plasmáticos de LDL aumentam, essas células de limpeza degradam quantidades aumentadas de LDL, no entanto se a concentração de ésteres de colesterol eleva-se demasiadamente, essas são convertidas para células espumosas que são componentes clássicos das placas ateroscleróticas (GOTTO, 1992).

2.5.1.5. Lipoproteína de alta densidade HDL

As HDL é uma lipoproteína que consiste em maior parte de proteínas e menor proporção de colesterol. Sua síntese secreção ocorre no fígado e intestino. Estas lipoproteínas são inicialmente sintetizadas na forma de um precursor que a partir da incorporação de colesterol não-esterificado adquire a forma final da lipoproteína. Todavia a HDL nascente do intestino, recentemente secretada, contém somente a apolipoproteína A e estão ausentes a apolipoproteínas C e E. Assim as apolipoproteínas são sintetizadas no fígado e transferidas a HDL intestinal quando esta se encontra no plasma. A principal função da HDL é atuar como depósito das apolipoproteínas C e E que são indispensáveis ao metabolismo das quilomícrons e VLDL. (HAPER 1994).

A lipoproteína HDL consiste de duplas camadas discóides contendo apolipoproteínas e colesterol livre. A enzima lecitina-colesterol-acetiltransferase (LCAT) de origem hepática e intestinal e a apolipoproteína ativadora da LCAT, presentes no plasma catalisam a formação de ésteres de colesterol. A catálise pela LCAT converte os fosfolipídios e colesterol livre em ésteres de colesterol e isolecitina. Os ésteres de colesterol, com caráter mais apolar penetram no interior hidrofóbico da bicamada, enquanto isolecitina é transferida para a albumina plasmática. A reação continua, gerando um núcleo não polar que empurra a dupla camada até que se forme uma HDL pseudomicelar e esférica coberta por uma película superficial de lipídios e apoproteínas polares. À medida que se acumulam maiores quantidades de colesterol no interior da lipoproteína, esta adquire uma configuração esférica, na qual se avista o núcleo hidrofóbico rodeado por uma capa protéica hidrossolúvel (GINSBERG, 1994; GRUNDY, 1990; BREWER et al., 1998; BOSTOM et al., 1996; FIELDING et al., 1995).

O colesterol esterificado pode ser transferido das lipoproteínas de densidade baixa, por exemplo: quilomícrons, VLDL, e LDL, para HDL por meio de uma *proteína transferidora de ésteres de colesterol-CETP* (transporte reverso de colesterol), que é outra proteína do HDL. Assim a proteína permite a transferência dos ésteres de colesterol da HDL para o fígado via quilomícrons remanescentes e VLDL ou via captação das LDL pelo fígado. A HDL pode ser

captada diretamente no tecido hepático, de tal forma que seu colesterol possa ser eliminado pelas secreções biliares. O sistema LCAT está envolvido na remoção do excesso de colesterol não esterificado das lipoproteínas e dos tecidos. O fígado, e possivelmente o intestino, parece ser os sítios finais das apolipoproteínas das HDL (GINSBERG, 1994; GRUNDY, 1990; BREWER et al., 1998; BOSTOM et al., 1996; FIELDING et al., 1995).

Este ciclo de transporte de colesterol dos tecidos para o fígado proposto pelas HDLs explica porque suas concentrações séricas variam reciprocamente com as concentrações dos quilomícrons e as VLDL e diretamente com a atividade da lipoproteína-lipase. As concentrações de HDL são inversamente relacionadas com a incidência de aterosclerose coronariana, possivelmente porque refletem a eficiência da remoção de colesterol dos tecidos. (CHEUNG, 1994).

2.5.1.6. Lipoproteína (a)

A Lipoproteína (a) possui uma estrutura semelhante à LDL, com a apo (a) ligada a apo B-100. Elevações das concentrações plasmáticas de lipoproteína (a) (Lp(a)) estão associadas a prevalências aumentadas tanto da aterosclerose coronária como doença cerebrovascular. O acúmulo de Lp (a) nas placas ateroscleróticas humanas está bem documentada. Após o deslocamento para dentro da parede arterial, as partículas de Lp(a) podem ligar-se a componentes de uma lesão aterosclerótica prematura, principalmente ao fibronogênio, as glicosaminoglicanos sulfatados e a fibronectina. Deste modo, as partículas são imobilizadas, contribuindo assim para o acúmulo extracelular de ésteres de colesterol na parede. Por outro lado a LP(a) imobilizada pode sofrer oxidação. Estudos relatam que a Lp(a) apesar de ser um fator independente, está mais fixa a placa ateromatosa do que o colesterol LDL, sugerindo uma maior aterogenicidade do que o LDL.

A Lp(a) pode exercer efeitos pró-trombóticos como consequência de sua implicação no sistema fibrinolítico. A similaridade com o plasminogênio tem dado suporte a possibilidade de Lp(a) contribuir para a aterogênese e trombogênese. Estas características podem ser sumarizadas como a seguir:

A Lp(a) tem sido identificada dentro das lesões aterometosas apresentando-se ligada à fibronectina (presentes nas lesões ateromatosas) e glicosamino glicanos (presentes na paredes arterial). Esta lipoproteína atravessa o endotélio vascular e alcança a íntima contacta. Esta pode ser oxidada in vitro e promover a formação de células espumosas. Induz a prorriferação de células musculares lisas através da inibição do plasmogênio forma inativa da enzima plasmina (que promove a clivagem da fibrina insolúvel em fragmentos solúveis) que somente se transforma na forma ativa na presença de ativadores específicos ligados a fibrina. Assim a ligação da Lp(a) com o fibrinogênio imobilizado e fibrina resulta na inibição da ligação dos plasminogênios a seus substratos podendo afetar a fibronólise, devido a menor formação de plasmina, e atrasando a lise de coágulos e favorecendo a trombose (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 1996 e MARTINEZ, T. L. R.; LORENÇO, D. M., 1996).

2.6.Disfunções Lipidêmicas

2.6.1.Doenças Aterosclerótica cardiovasculares e a relações com Lipídios Séricos

A corianariopatia (CHD) caracteriza-se por um conjunto de doenças que envolvem a rede de vasos sanguíneos que circundam o coração e suprem o miocárdio. É a maior causa de óbito atualmente e responsável por 80% das mortes cardíacas. Embora a maior parte das mortes por CHD ocorra em pessoas acima da idade de 65 anos, os grandes números de mortes prematuras levaram a pesquisas extensas nas áreas de identificação e prevenção. Acumulou-se uma literatura monumental a partir de estudos epidemiológicos, laboratoriais, clínicos, prospectivos e intervencionais, que procuram compreender porque apenas certos indivíduos desenvolvem CHD, particularmente quando este leva a morte prematura.

As coronárias, como outras artérias no organismo, estão sujeitas à aterosclerose, que consiste em um espessamento ou estreitamento das paredes, provocados pela invasão de lipídios, primeiramente colesterol e outras

substâncias, dentro da íntima, ou a camada interna, formando placas. A medida em que a placa aumenta, a artéria pode se tornar tão estreita que a circulação fica seriamente diminuída e pode ficar totalmente obstruída devido à formação de um coágulo (trombo). O coágulo pode ser formado por hemorragia da placa em si ou chegar ao local a partir de outro ponto do organismo. A artéria também pode sofrer um espasmo muscular que interfere na circulação. A isquemia resultante provoca um infarto ou morte da porção do miocárdio que fica privado de oxigênio e nutrição. A capacidade do coração de continuar batendo, vai depender da extensão da musculatura envolvida, da presença e circulação colateral e das necessidades de oxigênio (KRAUSE e MAHAN, 1995).

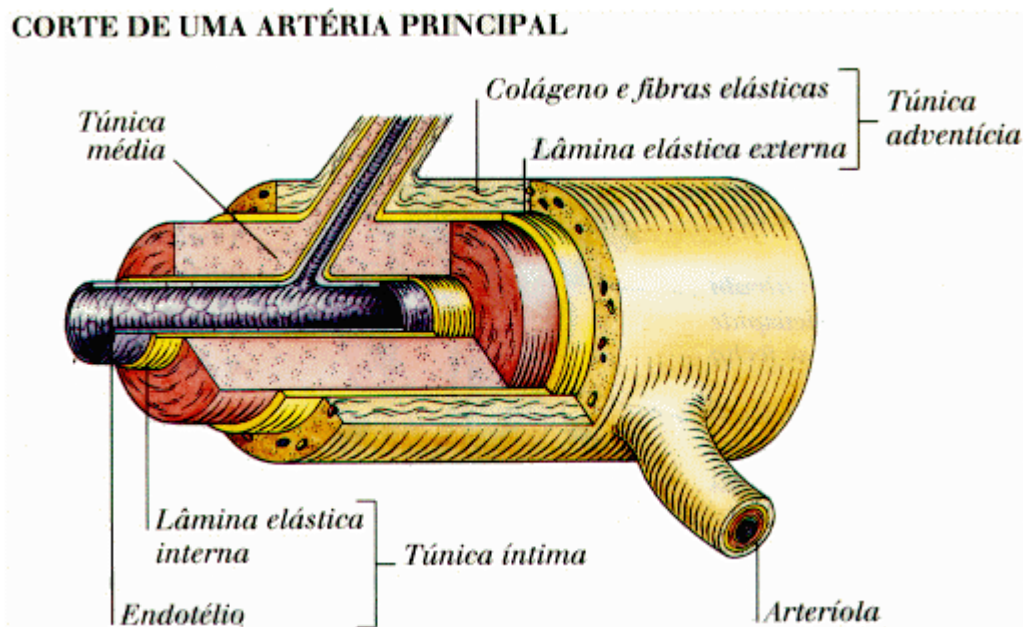


Figura 6-Representação de um corte de uma artéria

Hipercolesteromia: O colesterol foi implicado na etiologia da aterosclerose desde que Anitshkow induziu, em 1913, placas ateroscleróticas em coelhos e identificou o colesterol como seu principal componente. A maioria dos dados foram obtidos como colesterol sérico total. No entanto, agora parece que os níveis séricos das lipoproteínas de transporte, LDL e HDL, são mais significativos em termo de causa, prevenção e previsão.

Hipertrigliceridemia: A hipertrigliceridemia é provocada por um aumento de VLDL, resultando em um nível plasmático de triglicerídios em jejum acima de 500mg/dL. Níveis mais altos, do que 750 a 1000 mg/dL, também envolvem o acúmulo de quilomícrons e um plasma com aspecto leitoso. Em níveis extremos, a condição é caracterizada por xantomas e dor abdominal com risco de pancreatite quando os níveis estão acima de 1000 mg/dL. A maioria dos casos limítrofe é causada por fatores exógenos ou secundários, como a obesidade, diabetes não controlado, hipotireoidismo não tratado e ingestão excessiva de álcool. Níveis de triglicerídios abaixo de 250 mg/dL com colesterol normal não estão associados com risco de doenças (KRAUSE, 1995).

2.7.Papéis de lipoproteínas em coronariopatias (CHD):

As LDL parecem estar envolvidas no transporte de colesterol dentro da parede arterial. Alguns estudos sugerem que a captação de LDL por macrófagos (a atração, se faz devido a fatores quimioestáticos) na camada íntima procede com desenvolvimento da camada gordurosa.

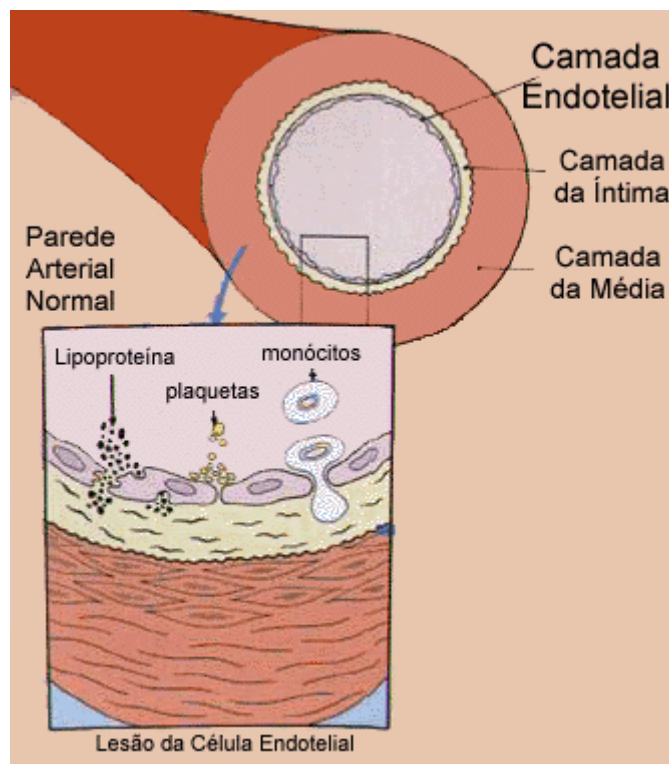


Figura 7- Início da formação de lesões em células endoteliais

Embora a relação entre a LDL com aterosclerose seja conhecida a algum tempo uma relação inversa com HDL foi conhecida mais recentemente. Este efeito protetor foi confirmado por vários estudos, em que o aumento de HDL e reduções de LDL simultâneos durante a terapia com gemfibrozil foi acompanhado com uma redução 34% nas taxa de infarto do miocárdio (GORDON E RIFKIND, 1989).

A relação inversa de HDL ainda não foi totalmente identificada, sugerindo-se que esta estaria envolvida diretamente no processo de acúmulo e formação de placa do colesterol, mas os níveis séricos desta lipoproteína indicariam um transporte saudável que não levaria a aterosclerose. Embora o colesterol seja sempre a mesma substância química, este pode ser designado popularmente de colesterol “bom” ou “ruim” dependendo da forma de transporte, HDL ou LDL.

Os níveis de LDL estão elevados em indivíduos que possuem dietas ricas em gordura saturada e colesterol. Considera-se que estas gorduras da dieta interfiram com a “clearance” de LDL no fígado. Os altos níveis de LDL estão associados a obesidade, diabetes, hipotireodismo e tipos familiares de hiperlipidemia citado anteriormente. O estrogênio reduz a concentração de LDL em graus variados, dependendo da proporção entre estrogênio e progesterona. As variações lipídicas sofrem importantes modificações após a menopausa, habitualmente com uma brusca elevação dos níveis séricos do colesterol total e da fração LDL, com discreta e progressiva do HDL. Estes achados estão relacionados com a menor síntese de estrógenos neste período.

Na tabela abaixo algum destes fatores são apresentados:

Tabela 1 Causas da diminuição do colesterol-HDL sérico

| |
|--|
| Fumo, Obesidade, Inatividade |
| Esteróides androgênicos e relacionados Androgênios |
| Agentes progestacionais |
| Esteróides Anabolizantes |
| Agentes bloqueadores adrenérgicos |
| Hipertrigliceridemia |
| Fatores genéticos |

A maioria dos estudos no passado dosava apenas colesterol total. Embora a ênfase atual seja nas formas de lipoproteínas de transporte de colesterol, o colesterol total continua sendo dosado em larga escala devido seu teste apresentar-se mais simples, menos dispendioso e não requerer nenhum jejum prévio. O colesterol total é constituído, em grande maioria por LDL e HDL.

2.8-Fatores de riscos de arterosclerose

Dados epidemiológicos identificam de forma consistente os níveis sanguíneos de lipídios e fatores ambientais, particularmente fatores dietéticos, que caracterizam populações com alta incidência de CHD. Estes achados são corroborados por estudos clínicos, laboratoriais em animais, embora estudos com indivíduos deixem de fornecer resultados uniformes por causa da heterogeneidade dos fatores de risco e de suas interações. Estudos prospectivos estabeleceram relações positivas entre o colesterol sérico e CHD. Mais recentemente, as concentrações das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e de baixa densidade (LDL) foram identificadas como preditivas de risco de cardiopatia. Obesidade e falta de exercícios também foram incriminados.

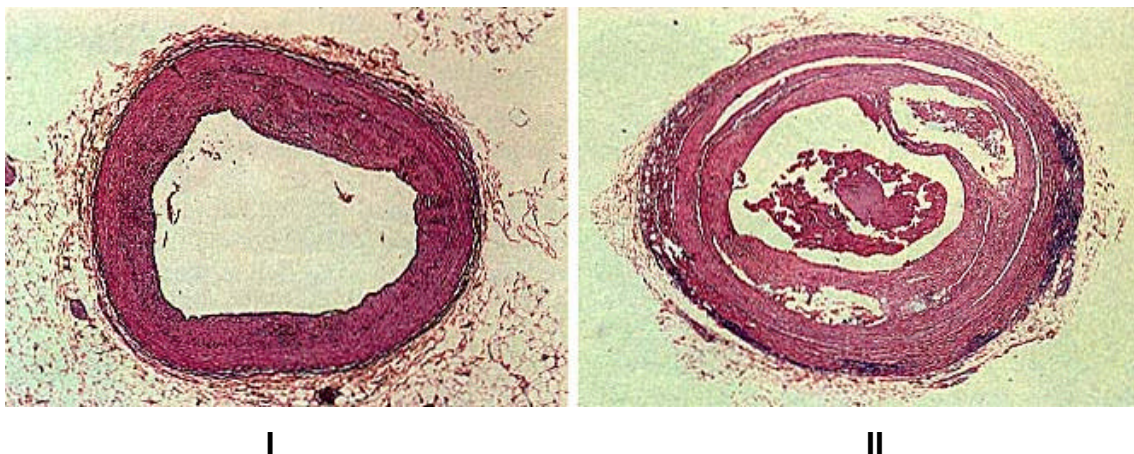


Figura 8- Observação de uma artéria normal (I) e uma artéria com o processo de aterosclerose evidenciado (II).

2.8.1-Fatores de risco incontroláveis

Entre os fatores de risco incontroláveis da CHD estão a idade, o sexo, a raça e a hereditariedade. Ataques cardíacos precoces ocorrem predominantemente em homens; a suscetibilidade a CHD aumenta linearmente com a idade. A incidência e a mortalidade aproximadamente dobram a cada período de cinco anos após a idade de 5 anos após a idade de 24 anos. As taxas de CHD são 3 a 4 vezes mais altas em homens do que mulheres durante a meia idade, e duas vezes maiores em idosos.

Ataques precoces ocorrem predominantemente em homens. As mulheres raramente têm doença cardiovascular durante a idade fértil sugerindo que os hormônios sexuais femininos sejam um fator de protetor. Mesmo após a menopausa, no entanto, a incidência de CHD entre as mulheres fica um pouco abaixo que a dos homens.

Fatores genéticos que predisõem á CHD são provavelmente relacionadas aos controles genéticos do colesterol sérico e da concentração de lipoproteína. Membros de famílias com histórias de ataques cardíacos são considerados na categoria de risco mais elevado para a CHD. O risco nos homens com uma história familiar de CHD é de 1,5 a 2 vezes maior do que para homens sem, estória, o fator genético é um risco um pouco menor nas mulheres. Negros de ambos os sexos são menos suscetíveis do que os brancos.

2.8.2-Fatores de risco controláveis não lipídicos

Existem correlações muito altas com o fumo, Hipertensão e obesidade. A intolerância a glicose e a falta de atividade física foram consideradas, também como fatores de risco.

Fumo; em populações ingerindo dieta média rica em ácidos graxos saturados e colesterol com os níveis séricos elevados, o fumo torna-se um grande fator de risco para CHD. O risco aumenta com o número de cigarros consumidos a cada dia. Deixar de fumar pode reduzir o risco em até 50%.

Hipertensão; A hipertensão parece agravar o processo aterosclerótico, possivelmente enfraquecendo as paredes das artérias em pontos de pressão

mais alta, estimulando assim a invasão de colesterol e lipídios. Os níveis de HDLc são mais baixos na hipertensão.

Obesidade: A obesidade é um fator de risco independente para CHD quando avaliada em estudos de longa duração com número adequado de indivíduos. O mecanismo deste efeito não é claro, mais pode ser relacionado com o fato de que os níveis de LDL-colesterol bastante elevados.

Inatividade; dados relacionados com a inatividade à CHD são conflitantes. Não foi estabelecida uma relação forte entre exercícios e a incidência de CHD, muito embora saiba-se que os exercícios elevam os níveis séricos de HDL-colesterol, possivelmente através de uma redução da atividade da lipase hepática, que também é vista durante a redução de peso. Também já se aventou a teoria de que o aumento da vascularização do miocárdio, resultante do exercício potencializa a evolução da circulação colateral que contribui para a sobre vida após um ataque cardíaco.

2.9-Atorvastatina Cálcica

Em 1976, Endo e colaboradores isolaram a compactina da cultura de *Penicillium citrinum*, substância que se revelou excelente inibidora da síntese do colesterol, mas, por sua toxicidade, não reunia condições de uso clínico. Posteriormente, foram investigados diferentes fungos, tendo sido isolada a lovastatina da cultura do *Aspergillus terreus*, com igual propriedade da anterior, mas com mínima toxicidade. Desde então foram produzidas várias outras substâncias com fórmulas estruturais semelhantes às acima referidas, todas mostrando efeito inibidor da síntese do colesterol. Esse conjunto de fármacos recebeu a denominação genérica de vastatinas. No mercado, as seguintes estão disponíveis: lovastatina, sinvastatina, pravastatina, fluvastatina e atorvastatina. Está previsto para breve o lançamento da cerivastatina. Os dados de diferentes pesquisas demonstram que essas drogas têm efeitos metabólicos muito semelhantes, ainda que haja entre elas várias diferenças farmacológicas (SITE MEDICAMENTO LIPTOR).

Todas as vastatinas têm em comum um anel hidronaftaleno. Lovastatina e pravastatina foram obtidas, respectivamente, de cultura dos fungos *Aspergillus terreus* e *Nocardia autrophica*. A sinvastatina resultou de pequena modificação na fórmula estrutural da lovastatina (adição do grupo metila). A fluvastatina, a atorvastatina e a cerivastatina são drogas sintéticas. Essas vastatinas e a pravastatina são compostos ativos na forma de anéis abertos. A lovastatina e a sinvastatina são prodrogas, apenas sendo ativas, "in vivo", após metabolizadas para a forma de anel aberto.

A Atorvastatina é um inibidor seletivo, competidor da enzima HMG-CoA redutase. Esta droga é a única em sua classe indicado especificamente para promover a redução da concentração de colesterol-LDL e IDL em pacientes com hipercolesterolemia. Seu fabricante, o laboratório Parke Davis, efetuou diversas pesquisas com este medicamento, revelando que sua administração em doses recomendadas o torna mais eficaz do que doses usuais de outros inibidores da enzima HMG-CoA redutase. Estudos em pacientes com hipercolesterolemia que recebem a atorvastatina cálcica, comprovam que este composto apresentou uma maior redução nos níveis de colesterol total, LDL-IDL-colesterol, na apolipoproteína B, do que os compostos lovastatina, pravastatina e sinvastatina. Os aumentos da lipoproteína colesterol-HDL eram similares entre os agentes.

A terapia da combinação com atorvastatina e colestipol produziu uma redução de 10% maior na concentração de colesterol-LDL e colesterol-IDL do que a atorvastatina sozinha, entretanto, as reações adversas eram maiores.

A atorvastatina possui uma meia vida longa e uma seletividade hepática maior. Isto pode explicar porque este composto é mais potente do que outros inibidores da enzima HMG-CoA redutase. Devido ao seu grande potencial a atorvastatina pode também ser usada no tratamento da hipercolesterolemia familiar homozigota. A aprovação final do FDA foi concedida em dezembro de 1996.

A atorvastatina calcica é um inibidor competitivo da β -hidroximetilglutaril-CoA redutase. Esta enzima é uma enzima hepática responsável pela conversão de HMG-CoA a mevalonato, um precursor de esteróides incluindo o colesterol. A inibição da β -HMG-CoA redutase diminui a concentração de mevalonato e conseqüentemente os níveis de colesterol. Isto, por sua vez,

resulta numa diminuição da ligação de colesterol a receptores de colesterol-LDL e conseqüentemente numa redução desta lipoproteína na circulação. Como os outros inibidores da enzima HMG-CoA redutase a atorvastatina não exhibe nenhum efeito no metabolismo hepático antipirínico.

A atorvastatina é administrada via oral. Depois de sua administração, a droga é absorvida rapidamente com os picos máximos de concentrações no plasma ocorrendo dentro de 1 à 2 horas. A extensão da absorção aumenta em proporção à dose da atorvastatina. A bioavaliabilidade absoluta é aproximadamente 14% e a disponibilidade sistêmica da atividade inibitória da HMG-CoA-redutase de é aproximadamente 30%. A ingestão de alimentos diminui a taxa e a extensão da absorção da atorvastatina de aproximadamente 25% e de 9%, respectivamente, entretanto, a redução do colesterol-LDL e colesterol-IDL é similar se a droga está sendo administrada junto ou separadamente da alimentação. Similarmente, as concentrações da atorvastatina estão mais elevadas no plasma durante o período da manhã do que no período da noite, porém a redução das lipoproteínas colesterol-LDL e colesterol-IDL é a mesma independente da hora na qual foi administrada.

As concentrações de atorvastatina no plasma são mais elevadas em pacientes idosos saudáveis do que em adultos novos, entretanto, a redução da lipoproteínas colesterol-LDL e colesterol-IDL é comparável. De acordo com o fabricante a eliminação da atorvastatina em humanos esta em torno de 14 horas após sua eliminação.

Ainda que tenham sido demonstradas diferenças pontuais entre as várias vastatinas, seu efeito hipolipemiante comum condiciona a clara possibilidade da prevenção da doença aterosclerótica, com evidentes repercussões sobre os índices de morbidade e mortalidade. Os dados disponíveis permitem também admitir que elas exercem efeitos diretos sobre a parede arterial (antiinflamatórios e antioxidantes) e possivelmente sobre elementos trombogênicos, independentemente dos efeitos hipolipemiantes.

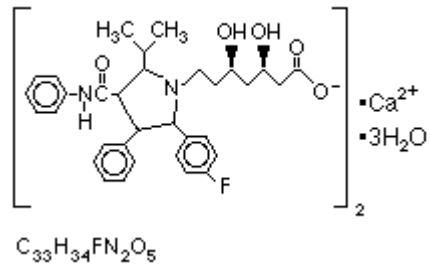


Figura 9- Estrutura da atorvastatina cálcica

3-MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho teve como objetivo efetuar modificações na estrutura do flavonóide rutina, a partir da complexação com organoestânicos, e promover teste sobre o efeito destes complexos no controle do colesterol, triacilgliceróis, colesterol HDL e colesterol LDL sanguíneo, efetuando a comparação dos resultados obtidos pelos complexos, com o medicamento líptor que possui o principio ativo atorvastatina cálcica, bem como efetuar testes toxicológicos destes complexos sobre o metabolismo de constituintes como uréia, ácido úrico, glicose, proteínas-totais, albumina, bilirrubina total, cálcio, fósforo, gama glutamil transferase (Gama-GT) e as enzimas transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e transaminase glutâmico oxaloacética (TGO).

3.1-Síntese dos complexos do flavonóide rutina com os organoestânicos [SnCl₂Ph₂], [SnClPh₃], [SnCl₃Ph] e [SnCl₄]

3.1.1- Procedimento Experimental

3.1.1.1- Reação de rutina com o organoestânico [SnCl₂Ph₂] (SN1)

Pesou-se 1 g do flavonóide Rutina (1,638. mmols) e 0,570 g do organoestânico [SnCl₂Ph₂] (1,638. mmols). Transferiu-se o organoestânico para um tubo de Schlenk. Em seguida colocou-se o sistema sob atmosfera inerte. Adicionou-se 50 mL de clorofórmio e, posteriormente, o flavonóide rutina, mantendo-se o sistema sob agitação constante por 4 horas. Um sólido amarelo brilhante foi separado por filtração ao ar. (Rendimento \cong 63,69%)

3.1.1.2-Reação da rutina com o organoestânico [SnClPh₃] (SN2)

Pesou-se 1 g do flavonóide rutina (1,638. mmols) e 0,641 g do organoestânico [SnCl₂Ph₂] (1,638. mmols). Transferiu-se o organoestânico para um tubo de Schlenk. Em seguida colocou-se o sistema sob atmosfera inerte. Adicionou-se 50 mL de acetonitrila, e, posteriormente, o flavonóide rutina, mantendo-se o sistema sob agitação constante por 6 horas à temperatura de 65 °C. Retirou-se o aquecimento e manteve-se a reação sob agitação por mais 16 horas. Observou-se a mudança de coloração da solução. Um sólido amarelo foi separado por filtração ao ar. (Rendimento \cong 60%).

3.1.1.3-Reação da rutina com o organoestânico [SnCl₃Ph] (SN3)

Pesou-se 1 g do flavonóide Rutina (1,638. mmols) e 0,641 g do organoestânico [SnCl₃Ph] (1,638. mmols). Transferiu-se o organoestânico para um tubo de Schlenk. Adicionou-se 50 mL de acetonitrila, e, posteriormente, o flavonóide rutina. A reação foi mantida sob a atmosfera inerte, temperatura ambiente e agitação constante durante 24 horas. Filtrou-se a mistura reacional obtendo-se um sólido amarelo (rendimento \cong 66,45%).

3.1.1.4- Reação de Rutina com o organoestânico [SnCl₄] (SN4)

Pesou-se 0,800 g do flavonóide Rutina (1,282. mmols) e 0,151mL do organoestânico [SnCl₄] (1,282. mmols). Transferiu-se o flavonóide rutina para um tubo de Schlenk e em seguida, colocou-se o sistema sob atmosfera inerte. Adicionou-se 50 ml de acetonitrila. Com auxílio de uma seringa o reagente organoestânico [SnCl₄] foi transferido para a solução do flavonóide presente no tubo de Schlenk. Imediatamente observou-se a precipitação de um sólido amarelo brilhante. A reação foi mantida a atmosfera inerte, temperatura ambiente e agitação constante durante 6 horas. Filtrou-se ao ar, obtendo-se um sólido amarelo ouro. (Rendimento \cong 80%).

3.2-Preparo das cápsulas utilizadas

No primeiro experimento, onde os efeitos hipolipodêmicos dos compostos sintetizados foram avaliados, em cada grupo foram administradas cápsulas de 5 mg. No segundo experimento, onde a toxicologia de apenas duas substâncias foi avaliada, em cada grupo foram administradas cápsulas de 100 mg. Todas as cápsulas foram confeccionadas no próprio laboratório conforme a densidade do material. Inicialmente pesou-se os compostos.

Inicialmente, após a pesagem das substâncias à serem encapsuladas, promoveu-se uma prévia trituração com o auxílio de um cadinho (almofariz), transferindo o conteúdo para uma proveta cuidadosamente e de acordo com a tabela 2 acima completou-se o volume com talco. A partir da densidade apresentada escolheu-se cápsula mais adequada. Dos complexos em questão utilizados no primeiro ensaio todos foram encapsulados em cápsulas número 4 o que de modo geral possibilitou melhor administração via oral aos coelhos.

Tabela 2- Relação entre o volume da cápsula e o número industrial da cápsula a ser utilizada

| Volume por 200 cápsulas | Número industrial da cápsula | Volume obtido por cápsula |
|-------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 42 mL | 4 | 0,20 mL |
| 60 mL | 3 | 0,30 mL |
| 74 mL | 2 | 0,37 mL |
| 100 mL | 1 | 0,50 mL |
| 136 mL | 0 | 0,68 mL |
| 190 mL | 00 | 0,95 mL |

No segundo experimento devido ao maior volume exigido por cada cápsula, foram utilizadas cápsulas do número 3.

3.3-Ensaio biológicos

Todos os ensaios biológicos realizados foram efetuados em coelhos da raça Nova Zelândia Branco com 50 dias de idade.

A parte experimental dos ensaios biológicos do trabalho apresentado, tanto o tratamento dos animais como as dosagens analíticas, foi realizada no laboratório de Biofármacos localizado na Vila Gianetti, pertencente ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG. Os coelhos raça Nova Zelândia Branco utilizados nos experimentos descritos abaixo foram fornecidos pela cunicultura. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais recebendo água a vontade e 120 gramas de ração diária da marca Purina para os ensaios de avaliação do potencial hipolipidêmico e da marca Guabi para os ensaios toxicológicos.

3.3.1-Modelo experimental do ensaio biológico com hiperlipidemia induzida

Para o ensaio biológico, realizado com o objetivo de testar o potencial hipolipidêmico dos complexos do flavonóide rutina com organoestânicos, foram utilizados coelhos machos da raça Nova Zelândia branco, com 50 dias de idade, pesando em média 1200 g e alimentados com 120 gramas/dia da ração comercial da marca PURINA. Os testes foram executados utilizando 6 animais para cada grupo de substâncias testadas.

Para fins de comparação foram administrados em dois grupos individualmente, em substituição aos complexos sintetizados, o flavonóide Rutina isoladamente e o medicamento líptor cujo princípio ativo é a atorvastatina cálcica que já possui grande aplicabilidade na indústria farmacêutica na mesma concentração 5 mg.

Para que a indução da hiperlipidemia fosse obtida, foi incorporado a dieta dos animais, exceto para o grupo 1 controle, Colesterol 0,5 % e Ácido Cólico 0,1%.

A Tabela 3 demonstra a disposição dos animais em cada grupo e substâncias administradas

Tabela 3- Disposição dos animais em cada grupo e as substâncias-testes administradas

| Grupos | Tratamento utilizado |
|--------|---|
| 1 | Ração |
| 2 | Ração + Colesterol (0,5%) + Ácido Cólico (0,1%) |
| 3 | Ração + Colesterol (0,5%) + Ácido Cólico (0,1%) + Rutina |
| 4 | Ração + Colesterol (0,5%) + Ácido Cólico (0,1%) + SN1 |
| 5 | Ração + Colesterol (0,5%) + Ácido Cólico (0,1%) + SN2 |
| 6 | Ração + Colesterol (0,5%) + Ácido Cólico (0,1%) + SN3 |
| 7 | Ração + Colesterol (0,5%) + Ácido Cólico (0,1%) + SN4 |
| 8 | Ração + Colesterol (0,5%) + Ácido Cólico (0,1%) + Atorvastatina |

As dosagens dos constituintes sanguíneos colesterol-total, triacilgliceróis, colesterol-HDL e colesterol-LDL foram realizadas em três etapas. Inicialmente após 5 dias de adaptação dos animais caracterizando o tempo zero, após 15 dias de tratamento e com 30 dias concluídos sob o tratamento descrito. Os animais encontravam-se em jejum de doze horas e a coleta de sangue foi efetuada pelo plexo venoso retro-orbital utilizando-se capilar.

As amostras de sangue dos animais foram centrifugadas a velocidade de 7100 x g, durante 15 minutos, para a obtenção do soro. As dosagens sorológicas foram efetuadas no equipamento de dosagens multiparamétrico de Bioquímica (Alizé), utilizando kits da marca BioMérieux.

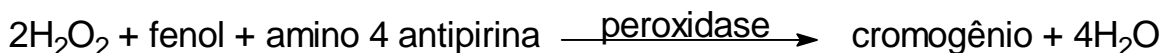
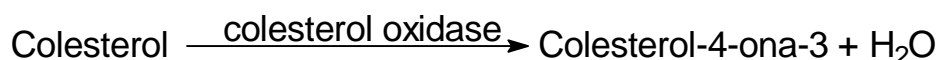
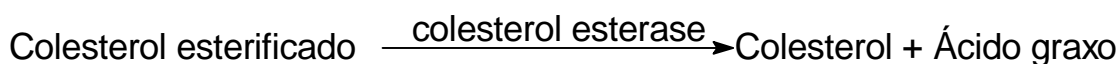
O equipamento foi programado para promover a mistura dos reagentes bem como cada soro apresentado separadamente conferindo assim maior confiabilidade a reação. O equipamento nos forneceu valores diretos das concentrações existentes em cada amostra, fazendo diretamente os cálculos que envolvem a absorção da amostra e branco como a relação estabelecida pela curva padrão elaborada previamente antes do início das análises.

A fórmula geral para a conversão da absorvância encontrada em concentração em mg/dL(para todos os constituintes exceto as transaminases que foi estabelecido em UI e proteína total g\ dL) foi a seguinte:

$$\frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{padrão}}} \times [\text{padrão}]$$

3.3.1.1- Determinação do colesterol-total

A análise colorimétrica do colesterol no soro obtido, baseou-se na transformação do colesterol esterificado e ácidos graxos, mediado pela colesterol esterase. O colesterol formado é oxidado pela enzima colesterol oxidase em colesteno-4-ona-3, liberando água oxigenada. A reação do fenol e amino-4-antipirina com a água oxigenada produzida na reação anterior pela ação da peroxidase origina um cromogênio, que possui absorvância em 500 nm, segundo as reações descritas abaixo:



Foi colocado no equipamento uma solução tampão fosfato pH 7,00 a 0,1 mol/L, contendo as respectivas enzimas solubilizadas e separadamente os soros sanguíneos a serem analisados.

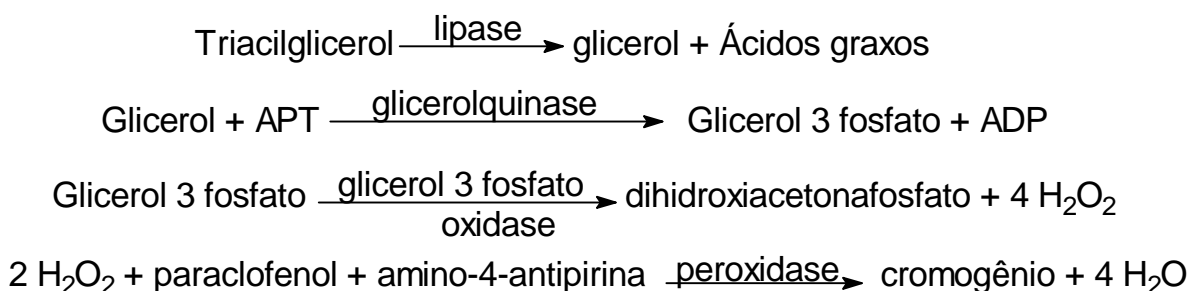
O equipamento foi programado para efetuar reação colorimétrica promovendo a mistura das soluções mencionadas acima e os determinados soros, que foram incubados a 37°C e analisados em um comprimento de onda de 500 nm. A partir de cálculos prévios o aparelho nos forneceu o valor direto da concentração de colesterol-total presente em cada soro em mg/dL.

3.3.1.2-Determinação do triacilglicerol

A dosagem dos níveis de triacilglicerol séricos foi efetuada por via inteiramente enzimática.

A enzima lipase degrada os triacilgliceróis em glicerol mais ácidos graxos. O glicerol obtido reagiu com o ATP, em presença de glicerolquinase, obtendo glicerol-3-fosfato e ADP. O glicerol-3 fosfato é oxidado a dihidroxiacetonafosfato pelo glicerol-3 fosfato oxidase, liberando água oxigenada. A água oxigenada, juntamente com paraclorofenol e amino-4-antipirina, em presença da peroxidase, transforma-se no cromogênio (que absorve em 505 nm), liberando água.

As equações foram as seguintes



Foi colocado no equipamento uma solução tampão fosfato pH 7,00 a 0,1 mol/L, contendo as respectivas enzimas solubilizadas e separadamente os soros sangüíneos a serem analisados.

O equipamento foi programado para efetuar reação colorimétrica promovendo a mistura das soluções mencionadas acima e os determinados soros, que foram incubados a 37°C e analisados em um comprimento de onda de 505 nm. A partir de cálculos prévios o aparelho nos forneceu o valor direto da concentração de triacilglicerol presente em cada soro em mg/dL.

3.3.1.3-Determinação do colesterol-HDL

O método de dosagem de colesterol-HDL baseia-se na precipitação dos quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) presentes na amostra. Esta precipitação é obtida a partir da adição de ácido fosfotúngico na presença dos íons magnésio. A dosagem sorológica desta lipoproteína requer um tratamento diferenciado nas amostras dos soros do sangue dos coelhos. Antes que o equipamento Alisé

possa efetuar a leitura do colesterol desta lipoproteína alíquotas de 500 µL de cada soro coletado são separadas e assim promove-se a adição de 1mL do reativo precipitante composto pelo ácido fosfotúngico (40g/L) e MgCl₂6H₂O (100g/L) pH 6,2. Esta nova solução permanece em descanso na geladeira durante 10 minutos entre 2-8°C. Centrifugam-se todas as amostras por 15 min a 11833 x g. No sobrenadante resultante desta precipitação esta presente a lipoproteína HDL colesterol. A análise é então efetuada pelo mesmo processo já descrito para a determinação de colesterol total.

3.3.1.4- Determinação do colesterol-LDL

As lipoproteínas são diferenciadas de acordo com sua densidade, seu comportamento elétrico e sua reatividade frente aos anticorpos específicos. Dado que as diferenças entre a composição ocasionam necessariamente variações importantes nas interações eletrostáticas e do tipo Van de Waals, tem-se estudado a influencia dos polímeros anfipáticos sobre as lipoproteínas separadas por centrifugação e constatando que algumas lipoproteínas precipitam especificamente com a adição de certos polímeros anfipáticos. O método de dosagem baseia-se na precipitação da lipoproteína colesterol-LDL presente nos soros a serem analisados pela adição do reativo precipitante composto por surfactante aniônico policíclico policondensado (0,8 g/L), surfactante aniônico policíclico (0,4g/L), tampão dioxano substituído (12,4 mmol/L) e tampão imidazol (25mmol/L) pH 6,1. A dosagem sorológica desta lipoproteína requer um tratamento diferenciado nas amostras dos soros do sangue dos coelhos. Antes que o equipamento Alisé possa efetuar a leitura do colesterol desta lipoproteína alíquotas de 50 µL de cada soro coletado são separadas e assim promove-se a adição de 1mL do reativo precipitante. Esta nova solução permanece em descanso na geladeira durante 30 minutos entre 2-8°C. Centrifugam-se todas as amostras por 5 min a 9466 x g. O precipitado de cada amostra, onde esta presente a lipoproteína colesterol-LDL, é solubilizado com o reativo 2 do kit onde estão presentes citrato trisódico 0,15 mol/L e cloreto de sódio 0,11 mol/L. A análise do colesterol presente nesta

lipoproteína foi determinado pelo mesmo processo já descrito na dosagem de colesterol total.

3.3.2-Modelo experimental para ensaio de toxicologia aguda de 30 dias

Para o ensaio biológico de toxicologia, realizado com o objetivo de avaliar o efeito dos complexos sintetizados no metabolismo de coelhos machos e fêmeas da raça Nova Zelândia branco, com 50 dias de idade, pesando em média 1200 g e alimentados com 120 gramas/dia da ração comercial da marca Guabi. A avaliação dos possíveis efeitos toxicológicos foi efetuada a partir das dosagens de uréia, ácido úrico, glicose, proteínas-totais, albumina, bilirrubina total, fósforo, cálcio, gama glutamil transferase (Gama-GT) e as enzimas transaminase glutâmico-piruvica (TGP), transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) bem como colesterol total, triacilgliceróis, colesterol-HDL, e colesterol-LDL. Os testes foram executados utilizando 3 animais de cada sexo por grupo de substâncias testadas.

De acordo com os resultados obtidos no primeiro experimento realizado, apenas os compostos SN2 e SN4 foram utilizados no segundo experimento (ensaio toxicológico). A concentração de substâncias-testes utilizada por cápsula foi de 100 mg.

Tabela 4 demonstra a disposição dos animais em cada grupo e substâncias administradas

Tabela 4- Disposição dos animais em cada grupo e substâncias-testes administradas

| Grupos | Coelhos machos | Coelhos Fêmeas |
|--------|----------------|----------------|
| 1 | Ração | Ração |
| 2 | Ração + SN2 | Ração + SN2 |
| 3 | Ração + SN4 | Ração + SN4 |

As dosagens dos constituintes sanguíneos colesterol-total, triacilgliceróis, colesterol-HDL, colesterol-LDL, uréia, ácido úrico, glicose, proteínas-totais, albumina, bilirrubina total, fósforo, cálcio, gama glutamil transferase (Gama-GT) e as enzimas transaminase glutâmico-piruvica (TGP), transaminase glutâmico oxaloacética (TGO). foram realizadas em três etapas. Inicialmente após 5 dias de adaptação dos animais caracterizando o tempo zero, após 15 dias de tratamento e com 30 dias concluídos sob o tratamento descrito. Os animais encontravam-se em jejum de doze horas e a coleta de sangue foi efetuada pelo plexo venoso retro-orbital utilizando-se capilar.

As amostras de sangue, de modo similar ao primeiro ensaio, foram centrifugadas a velocidade de 7100 x g, durante 15 minutos, para a obtenção do soro. As dosagens sorológicas foram efetuadas no equipamento de dosagens multiparamétrico de Bioquímica (Alizé), utilizando kits da marca BioMérieux.

A fórmula geral para a conversão da absorvância encontrada em concentração em mg/dL (para todos os constituintes exceto as transaminases que foi estabelecido em UI e proteína total g\ dL) foi a seguinte:

$$\frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{padrão}}} \times [\text{padrão}]$$

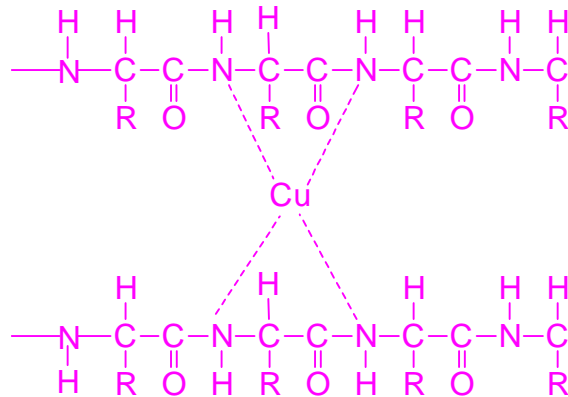
3.3.2.1-Determinação de proteínas totais

As proteínas totais do soro foram dosadas colorimetricamente pelo método do tipo Biureto, que consiste em complexar à proteínas a sais de cobre em meio alcalino, formando um complexo de coordenação entre o íon cúprico e quatro grupos NH das cadeias peptídicas.

Este complexo absorve em um comprimento de onda de aproximadamente 545 nm.

Foi colocado no equipamento uma solução alcalina de 245 mL contendo 0,2 mol/L de hidróxido de sódio, 5g/L de iodeto de potássio e 9g/L de tartarato de sódio e potássio, misturado com 5 mL de uma solução 150 g/L de sulfato de cobre e separadamente os soros sanguíneos a serem analisados.

O equipamento promoveu a mistura das soluções dos soros a serem analisados efetuando a reação colorimétrica. A partir de cálculos prévios o aparelho nos forneceu o valor direto da concentração de proteínas totais presente em cada soro em g/L.



Complexo de cor Violeta

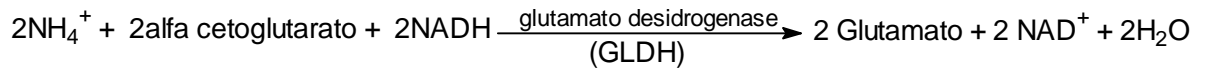
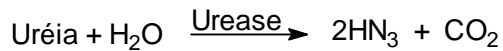
Figura 10 Adição de Íons cobre à proteína

3.3.2.2- Determinação de Albumina

Determinação colorimétrica de albumina sérica usando bromocresol no pH= 4,2.O padrão utilizado foi albumina bovina sérica 724,5 $\mu\text{mol/L}$ ($5\text{g}\backslash 100\text{mL}$ - $50\text{g}\backslash \text{L}$).Utilizando o mesmo método aplicado a proteínas totais

3.3.2.3-Determinação da Uréia

Para a determinação cinética, a uréia em meio aquoso foi transformada em amônia e gás carbônico, pela ação da uréase. O íon amônio, por sua vez, juntamente com α cetoglutarato e NADH, em presença do glutamato desidrogenase (GLDH), são convertidos a glutamato, NAD^+ e água, segundo as reações:

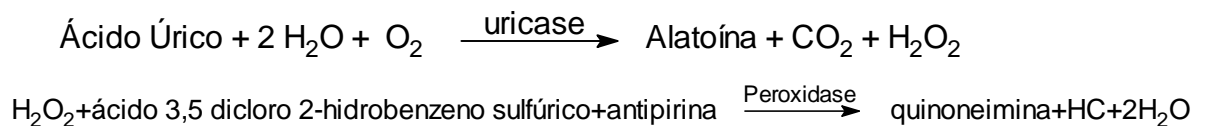


A solução contendo 0,29 mmol/L de NADH, GLDH \geq 1000U/l, Uréase \geq 5000 U/l e 0,4 mmol/L de ADAP, solubilizados com um tampão contendo 50 mmol/L de tris pH 8 e 4 mmol/L de α cetogluturato foi colocado no equipamento juntamente com os soros sanguíneos a serem analisados, em separadamente.

O equipamento foi programado para efetuar análise promovendo a mistura das soluções mencionadas acima e os determinados soros, que foram incubados a 37°C e analisados em um comprimento de onda de 340 nm. A partir de cálculos prévios o aparelho nos forneceu o valor direto da concentração de uréia presente em cada soro em mg/dL.

3.3.2.4-Determinação de Ácido Úrico

O ácido úrico na amostra foi determinado por sua reação com água e oxigênio em presença de enzima uricase, produzindo alatoína, gás carbônico e água oxigenada. A água oxigenada por sua vez, reagiu com o ácido 3,5 dicloro 2-hidroxibenzeno sulfúrico e amino 4 antipirina, numa reação catalisada pela peroxidase, fornecendo a quinoneimina, ácido clorídrico e água, segundo as reações:

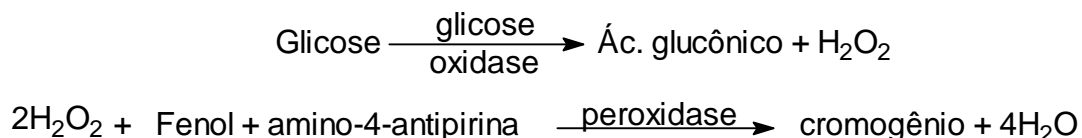


O equipamento foi devidamente programado para promover a mistura das soluções contendo as enzimas acima mencionadas na presença de um tampão pH $6,95 \pm 0,15$ a 150 mmol e os soros a serem analisados separadamente à temperatura controlada de 37°C e comprimento de onda de 520nm. O aparelho efetuou as leituras das amostras fornecendo a o resultado final já com a subtração das amostras pelo branco (solução tampão das

enzimas com o soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em mg/dL de ácido úrico em cada amostra de soro.

3.3.2.5- Determinação da concentração de Glicose

A determinação enzimática da glicose baseia-se na reação da glicose presente no plasma na presença de glicose oxidase formando a água oxigenada que em reação seguinte na presença de fenol e amino-4-antipirina e a enzima peroxidase forma um cromogênio e libera água, segundo as reações:



Foram colocados separadamente no equipamento, todas as soluções acima mencionadas e os soros sanguíneos a serem analisados.

O equipamento foi devidamente programado para promover a mistura das soluções contendo as enzimas acima mencionadas e separadamente os soros a serem analisados à temperatura controlada de 37°C e comprimento de onda de 505 nm. O aparelho efetuou as leituras das amostras fornecendo o resultado final já com a subtração das amostras pelo branco (solução tampão das enzimas com o soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em g/mL em cada amostra de soro.

3.3.2.6-Determinação de Bilirrubina Total

O kit Biomérieux foi utilizado para as dosagens da bilirrubina total. A determinação da concentração de bilirrubina total é efetuada na presença de dimetilsulfóxido (DMSO) a partir da reação diazotização com o ácido sulfanílico. O kit é composto por um reagente 1 onde estão presentes o ácido sulfanílico 25 mmol/L, ácido hidrocloreídrico 74 mmol/L e dimetil sulfóxido 7 mol/L e outro reagente onde está presente nitrato de sódio 17 mmol/l.

O equipamento foi devidamente programado para promover a mistura dos reagentes e separadamente os soros a serem analisados, separadamente à temperatura controlada de 37°C e comprimento de onda de 550 nm. O aparelho efetuou as leituras das amostras fornecendo a o resultado final já com a subtração das amostras pelo branco e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em mg/dL de bilirrubina total em cada amostra de soro.

3.3.2.7-Determinação de Cálcio

A dosagem colorimétrica do cálcio in vitro, presente no soro sanguíneo dos coelhos, sem desproteínação, é determinada pelo indicador azul de metilimol. Esta análise é feita com a adição do 8-hidroxiquinoleína, para que se possa evitar a interferência dos íons magnésio até uma concentração de 10 mg/dL.

Foi colocado no equipamento separadamente, uma solução alcalina contendo 8-hidroxiquinoleína, outra solução do indicador azul de metimol e soros sanguíneos a serem analisados.

O equipamento foi programado para efetuar análise promovendo a mistura das soluções mencionadas acima e os determinados soros, que foram incubados a 37°C e analisados em um comprimento de onda de 612 nm. A partir de cálculos prévios o aparelho nos forneceu o valor direto da concentração de cálcio presente em cada soro em mg/dL.

3.3.2.8. Determinação de Fósforo

Os íons fosfato em meio ácido formam com o mobilidato de amônio um complexo fosfomolibidílico cuja absorção a 340 nm é proporcional a concentração em fosfato na amostra.

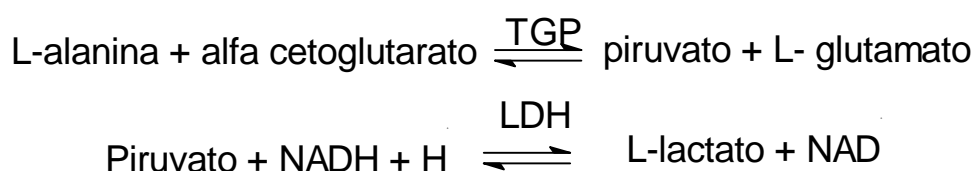
Foi colocado no equipamento separadamente, uma solução do reativo 2 que contem ácido sulfúrico a 200 mmol/L e o reativo mobilidato (heptamobilidato de amônio 0,8 mmol/L) e soros sanguíneos a serem analisados.

O equipamento foi programado para efetuar análise promovendo a mistura das soluções mencionadas acima e os determinados soros, que foram

incubados a 37°C e analisados em um comprimento de onda de 340 nm. A partir de cálculos prévios o aparelho nos forneceu o valor direto da concentração de fósforo presente em cada soro em mg/dL.

3.3.2.9-Determinação de transaminase glutâmico pirúvico (TGP)

A determinação cinética da atividade da TGP se baseou na conversão da L-alanina e α cetogluturato em piruvato e L-glutamato, mediado pela enzima. O piruvato formado reagiu com o NADH e o íon hidrônio, produzindo L-lactato e NAD^+ , numa reação catalisada pela lactato desidrogenase (LDH), segunda a reação:



O equipamento foi programado para o comprimento de onda de 340 nm com temperatura ajustada para 37°C. Foi colocado no equipamento uma solução contendo 0,18 mmol/L de NADH, LDH $\geq 1200\text{UI}$ e 15mmol/L de α cetogluturato, solubilizados com um tampão contendo 100 mmol/L de tris pH 7,5, com 500 mmol/L de L-alanina e separadamente os soros sanguíneos a serem analisados. O equipamento promoveu a mistura das soluções acima com os determinados soros. O aparelho subtraiu a absorvância encontrada com a leitura do branco (solução tampão das enzimas com soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em UI de TGP no soro sanguíneo.

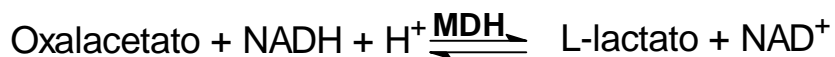
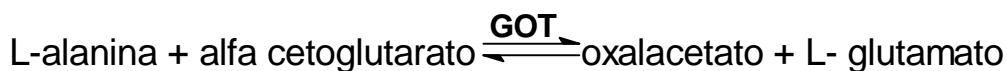
A fórmula geral para a conversão da absorvância em U/I foi a seguinte:

$$\text{U/I} = \text{absorvância encontrada} * 1746$$

3.1.2.10-Determinação da transaminase glutâmico oxalacético (TGO)

A determinação cinética da atividade da TGO se baseou na conversão da L-alanina e α cetogluturato em oxalacetato e L-glutamato, mediado por esta

enzima. O oxaloacetato formado reagiu com NADH e o íon hidrônio, produzindo L-malato e NAD⁺, numa reação catalisada pela malato desidrogenase (MDH) segundo as reações:



Foi colocado no equipamento uma solução contendo 0,18 mmol/L de NADH, LDH ≥ 1200UI, MDH ≥ 500 U/l e 12 mmol/L de α cetogluturato, solubilizados com um tampão contendo 80 mmol/L de tris pH 7,8, com 200 mmol/L de L-aspartato e separadamente os soros sanguíneos a serem analisados.

O equipamento foi devidamente programado para promover a mistura das soluções contendo as enzimas acima mencionadas e separadamente os soros a serem analisados à temperatura controlada de 37°C e comprimento de onda de 340 nm. O aparelho efetuou as leituras das amostras fornecendo o resultado final já com a subtração das amostras pelo branco (solução tampão das enzimas com o soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em UI de TGP em cada amostra de soro.

A fórmula geral para a conversão da absorvância em U/l foi a seguinte:

$$\text{U/l} = \text{absorvância encontrada} * 1746$$

3.1.2.11-Determinação cinética da atividade g Glutamil transferase (Gama-GT)



Foi colocada no equipamento uma solução contendo uma mistura de enzima γGT 10s e enzima γGT 20s e separadamente os soros sanguíneos a serem analisados. O padrão utilizado para construção da curva padrão foi o zymotrol.

O equipamento foi devidamente programado para promover a mistura das soluções contendo as enzimas acima mencionadas e separadamente os soros a serem analisados à temperatura controlada de 37°C e comprimento de onda de 405 nm. O aparelho efetuou as leituras das amostras fornecendo o resultado final já com a subtração das amostras pelo branco (solução tampão das enzimas com o soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em UI de TGP em cada amostra de soro.

A fórmula geral para a conversão da absorvância em U/I foi a seguinte:

$$U/I = \text{absorvância encontrada} * 1746(n*1111)$$

3.3-Testes estatísticos

Foram realizados experimentos casualizados onde se aplicou o teste de turkey (comparação entre as médias), teste de Dunnett (comparação de cada grupo com os grupos controles) e teste F (comparação entre os grupos controles).

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Caracterização dos complexos do flavonóide rutina com organoestânicos

4.1.1- Análise de CHN

A análise de CHN é efetuada na maioria dos processos de caracterização estrutural que envolva moléculas orgânicas. Este método possibilita a determinação da fórmula mínima de compostos produzidos em sínteses a partir da porcentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio presente na molécula do produto final da reação.

Tabela 5- Caracterização elementar e ponto de fusão para os complexos do flavonóide rutina

| Compostos | %C | %H | PF °C |
|--|-------------------------|-----------------------|-------------|
| Rutina (Rut) | (53,11) | (4,95) | 203,7-203,8 |
| [SnCl ₂ Ph ₂ (Rut)].H ₂ O | (48,17) 48,69 | (4,35) 5,32 | 198-199 |
| [SnClPh ₃ (Rut)].6H ₂ O | (48,95) 48,88 | (5,20) 5,44 | 206,8-207,6 |
| [SnClPh(Rut)].H ₂ O | (46,21) 48,13 | (3,89) 5,43 | 208-209 |
| [SnCl(Rut)].H ₂ O | (41,63) 41,66 | (3,49) 4,94 | 174d |

* d= ponto de decomposição

A tabela 5 apresenta a análise de CHN dos complexos sintetizados, que foi efetuada após a secagem das amostras no dessecador, sob vácuo por aproximadamente sete dias. A primeira análise efetuada de CHN, onde as amostras não apresentaram nenhum tratamento que pudesse promover a

secagem do material, apresentou porcentagem de C menores principalmente para o composto $[\text{SnClPh}_3(\text{Rut})].6\text{H}_2\text{O}$ (%C=42,40) sugerindo que estes compostos são higroscópicos.

A análise de cloreto foi efetuada utilizando-se o método de Volhard. Este método baseia-se na titulação com soluções padronizadas de tiocianato de potássio 0,5 mol/L, do excesso de nitrato de prata 05 mol/L (previamente padronizado com cloreto de sódio) colocado em amostras que contenham cloretos. O método de Volhard consegue determinar a quantidade de cloretos presentes em uma amostra desde que essa concentração não seja inferior a 10^{-4} . Provavelmente, houve perda de cloreto como HCl ou mesmo de Cl_2 durante a abertura da amostra com ácido nítrico inviabilizando o resultado, apesar da literatura sugerir a utilização deste procedimento (JEFFERY, P., 3 ed).

4.1.2-Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho é um método bastante utilizado na caracterização de materiais uma vez que aspectos estruturais estão intrinsecamente relacionados com os modos vibracionais das moléculas que os constituem. A caracterização do flavonóide rutina por infravermelho foi realizada por outros pesquisadores (TOLEDO, T., 1994). A natureza química dos compostos pode em algumas situações dificultar a atribuição de bandas características dos grupos funcionais pertencentes ao mesmo. Pequenas variações decorrentes do suporte utilizado são comuns. Por exemplo, absorções na região de 1500 a 1600 cm^{-1} são atribuídas a ligação C=C. TOLEDO, T., 1994, atribuiu às ligações C=C do flavonóide rutina isolado as bandas em 1600 e 1510 cm^{-1} . Uma sobreposição pode ser observada nesta região devido a utilização de nujol no procedimento da análise no infravermelho uma vez que este possui bandas bem característicos nesta região. Os complexos sintetizados apresentaram absorções nesta faixa as quais foram atribuídas ao estiramento assimétrico da ligação C=C nos compostos preparados como mostra a tabela 6.

Tabela 6-Absorções no infravermelho para os complexos com o Flavonóide Rutina

| Compostos | ν (C=C) | ν (C=O) | ν (Sn-C) | ν (Sn-O) | ν (Sn-Cl) |
|--|-------------|-------------|--------------|--------------|---------------|
| Rutina (Rut) | 1597 | 1654 | | | |
| [SnCl ₂ Ph ₂ (Rut)].H ₂ O | 1654 | 1654 | 361 | 435; 484 | 228; 231 |
| [SnClPh ₃ (Rut)].6H ₂ O | 1657 | 1658 | 383 | 455 | 231 |
| [SnClPh(Rut)]. H ₂ O | 1602 | 1654 | 361 | 456 | 232 |
| [SnCl(Rut)]. H ₂ O | 1596 | 1653 | - | 456 | 228 |

a-Absorções em cm^{-1}

Freqüências de absorção na região de 1500 a 1600 cm^{-1} são características do grupamento carbonila em compostos orgânicos de modo geral. TOLEDO, T., 1994, descreve em sua análise das absorções no infravermelho freqüências vibracionais de carbonila em compostos como a Quercetina, quercetrina e morina. A freqüência da carbonila destes compostos, de estrutura bem similar ao ligante utilizado neste trabalho foi observada na região de 1650 a 1670 cm^{-1} . A carbonila da rutina também teve sua freqüência vibracional descrita apresentando-se em torno de 1660 cm^{-1} o que não esta discrepante do valor mostrado na Tabela 2.

A análise para todos os complexos com o flavonóide rutina mostra que a banda correspondente a carbonila presente na estrutura do flavonóide não sofreu deslocamento significativo para baixa freqüência em relação ao ligante livre (Tabela 2). Estes resultados sugerem que a complexação dos organoestânicos com a rutina, em todas as reações, não deve ter ocorrido na região onde o grupamento carbonílico esta presente, ou seja, via o oxigênio da carbonila na estrutura da rutina. Deslocamentos nesta região podem ser característicos não somente pela ligação direta do átomo de Sn ao oxigênio cetônico. CARUSO F. et al. 1996, descreve um pequeno deslocamento na

banda característica de C=O do composto $(C_7H_7)_2Sn(Q_{Br})_2$ (onde $Q_{Br}H$: QH= 1R'-3-metil-4-R''(C=O)-pirazol-5-ona e $R' = C_6H_5$, $R'' = p\text{-Br-C}_6H_4$ de 1601 cm^{-1} para a faixa de 1588 cm^{-1} caracterizando neste caso uma interação a partir da formação de um anel quelato de 6 membros, em função da ligação Sn-O, obtido na síntese.

Os resultados de CHN em combinação com a análise por espectroscopia no infravermelho sugerem que todos os complexos sintetizados possuam moléculas de H_2O em sua composição. Determinadas absorções e até mesmo, modificações na feição espectral dos espectros no infravermelho podem ser atribuídos a presença de moléculas de H_2O na estrutura cristalina destes complexos (água de rede) bem como ligadas ao centro metálico (H_2O coordenada). Bandas na região de 3550 a 3200 cm^{-1} são atribuídas ao modo vibracional "balanço", $\delta(H_2O)$. A presença de um alargamento das bandas na faixa de 200 a 600 cm^{-1} também é uma característica marcante da presença de H_2O de rede neste compostos (NAKAMOTO, K., 1997). O flavonóide rutina é um composto altamente higroscópico. Na forma de cristais, este composto pode apresentar até três moléculas de água (H_2O de rede) na sua composição (MERCK INDEX., Tenth ed).

Os modos vibracionais da H_2O de acordo com Stefov et al.(1993) são "wagging" ($\rho_w(H_2O)$), "twisting" ($\rho_t(H_2O)$), "rocking" ($\rho_r(H_2O)$).

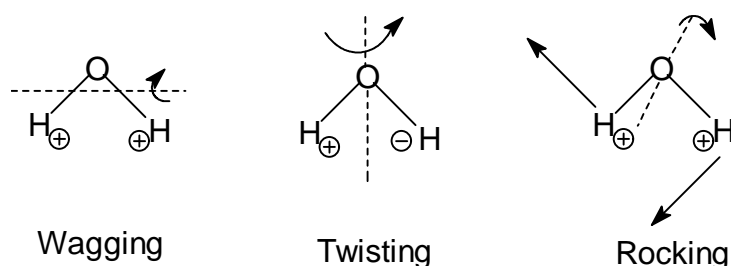


Figura 11- Modelos rotacionais da molécula de água

Moléculas de água coordenadas em complexos de Cr, Ni, Mn e Cu apresentam bandas na região de 800 a 450 cm^{-1} . Modos vibracionais do tipo "rocking" ($\rho_r(H_2O)$) e "wagging" ($\rho_w(H_2O)$) ocorrem na região de 390-575 cm^{-1} . Exemplos como os complexos de fórmula $[Cr(H_2O)_6]Cl_3$, $[Ni(H_2O)_6]SiF_6$,

[Mn(H₂O)₆SiF₆] e [Cu(H₂O)₄SO₄.H₂O] são descritos na literatura (NAKAMOTO, 1997).

A atribuição de bandas características de moléculas de H₂O coordenadas via infravermelho se torna difícil neste trabalho. Os espectros obtidos dos compostos sintetizados possuem nesta região outras absorções inerentes ao ligante rutina e que se mantiveram após a coordenação. Este fato pode ocasionar, caso algum dos compostos formados tenha moléculas de H₂O coordenadas, a sobreposição destas bandas impossibilitando a atribuição das mesmas.

A identificação de compostos orgânicos via espectroscopia no infravermelho ocorre na faixa de 4000 cm⁻¹ a 600 cm⁻¹. Entretanto a identificação de compostos de coordenação ocorre em uma faixa de frequência mais baixa. Observações na faixa do infravermelho distante, que compreende a faixa de 200 cm⁻¹ a 700 cm⁻¹, são de grande utilidade na determinação estrutural de compostos de coordenação. As vibrações ocorrem, por analogia com uma molécula diatômica, em função da constante de força de ligação, K e da massa reduzida, μ , (MAIA, J., R. S., 1990). A equação abaixo mostra como a correlação entre essas variáveis:

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \times \frac{K}{\mu}$$

ν = número de onda

As vibrações são função do peso atômico do metal em questão, neste caso o estanho, e da constante de força da ligação metal-ligante. Desta maneira a medida da constante de força pode ser estimada uma vez que a posição das bandas do espectro são influenciadas por propriedades químicas, como a basicidade do sitio coordenante, a carga no metal, a posição trans a elementos eletronegativos, como o oxigênio, no caso dos compostos sintetizados. Fatores externos podem também exercer influencia sobre estas bandas. A região de baixa frequência pode ser útil na determinação de isômeros uma vez que nesta região podemos determinar desdobramentos de bandas vibracionais, devido ao abaixamento na simetria da molécula.

Diversos trabalhos atribuem à ligação Sn-C, bandas na região de 500 a 590 cm^{-1} . Neste caso a ligação observada é entre o átomo de Sn e carbono alifático. Os Compostos como $[(\text{Me}_2\text{SnCl}_2)_2(\text{bip})]$, $[(\text{Et}_2\text{SnCl}_2)_2(\text{bip})]$, $[(\text{Et}_2\text{SnCl}_2)(\text{bip})]$, $[\text{Et}_2\text{SnCl}_2(\text{bip}\cdot\text{bip})]$, onde bip=2,2'-bipirimidina, apresentam absorções atribuídas a ligação Sn-C em torno de 577 cm^{-1} para o composto onde o grupo metila esta presente e 533 cm^{-1} para os compostos onde o grupo etila esta presente (CARUSO et al. 1996). Para os compostos como $[\text{Me}_2\text{SnCl}_2\text{L}]$, $[\text{Et}_2\text{SnCl}_2\text{L}]$, $[\text{BuSnCl}_2\text{L}]$, onde L=2-(2'-piridil) quinoxalina, as absorções atribuídas a ligação Sn-C apresentam-se em 579 cm^{-1} , 534 cm^{-1} e 589 cm^{-1} respectivamente, (GAROUFIS et al., 1999).

A literatura apresenta, a partir da análise de absorções no infravermelho próximo que um deslocamento da ligação Sn-C para menor frequência é observado quando os carbonos provem de um grupo aromático. Os compostos onde o estanho se encontra ligado ao carbono aromático apresentam absorções na faixa de 350-250 cm^{-1} . Exemplos destas absorções foram observados em compostos como $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{Sn}(\text{Q}')_2$ (289 e 252 cm^{-1} , em nujol), $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{Sn}(\text{Q}'')_2$ (290 cm^{-1} , em nujol), $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{Sn}(\text{Q}_{\text{Br}})_2$ (300 e 290 cm^{-1} , em nujol) No mesmo trabalho descrito encontramos compostos como $[(\text{CH}_3)_2\text{Sn}(\text{Q}')_2]$ que apresentam absorções atribuídas a ligação Sn-C na região de 596 cm^{-1} onde o átomo de Sn esta ligado a um átomo de carbono alifático (CARUSO et al. 1996).

A análise no infravermelho dos complexos sintetizados com o flavonóide rutina sugere que as absorções encontradas na faixa de 350 a 385 cm^{-1} correspondem à ligação Sn-C do grupo fenila presente no reagente organoestânico de partida.

De acordo com CARUSO et al., 1996, atribuiu-se à ligação Sn-O de compostos de formula geral $[(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{Sn}(\text{Q}')_2]$ (QH= 1R'-3-metil-4-R''(C=O)-pirazol-5-ona; e R'=R''=C₆H₅) bandas na região de 500 a 400 cm^{-1} . Os complexos obtidos neste trabalho apresentaram absorções nesta região como mostra a tabela 6, as quais foram atribuídas ao estiramentos da ligação Sn-O.

A frequência de ligação entre metal-fluor terminal (M-F) ocorre na região de 400-200 cm^{-1} , metal-bromo (M-Br) na região de 200-100 cm^{-1} e a ligação entre metal-cloro (M-Cl) geralmente é observada na região de 300-200 cm^{-1} (NAKAMOTO, 1997). Vários fatores influenciam a posição da frequência de

vibração da ligação metal-X, como o estado de oxidação bem como a simetria do complexo de coordenação. De acordo com WHARF e SHRIVER (1969) a constante de força da ligação Sn-X (onde X=halogênio) de compostos halogenoestânicos são proporcionais ao número de coordenação do metal dividido pelo número de coordenação do complexo. É interessante notar que o $\nu(\text{Sn-Cl})$ do íon livre SnCl_3^- (289, 252, cm^{-1}) ocorre em frequências mais altas em compostos heterobimetálicos. Por exemplo, duas frequências de estiramento $\nu(\text{Sn-Cl})$ do composto $[\text{Rh}_2\text{Cl}_2(\text{SnCl}_3)_4]^{2-}$ foram atribuídas em 339 e 323 cm^{-1} . De acordo com SHRIVER e JOHNSON (1967), a constante de força da ligação entre L-X, onde L=estanho e x=halogênio, aumenta significativamente se X for mais eletronegativo do que L, após a formação da ligação entre o estanho e um íon de metal de transição. No exemplo acima, cloretos são mais eletronegativos do que o estanho. Para os compostos sintetizados neste trabalho, $\nu(\text{Sn-Cl})$ é esperado em frequências mais baixas uma vez que não há possibilidades de formação de compostos de natureza química heterobimetálica.

Estiramentos característicos da ligação entre os átomos de estanho e cloro (Sn-Cl) podem ser atribuídos em todos os complexos sintetizados (Tabela 2), em torno de 230 cm^{-1} . No composto $[\text{SnCl}_2\text{Ph}_2\text{Rut.}]2\text{H}_2\text{O}$, um pequeno desdobramento foi observado com absorções em 228 e 231 cm^{-1} . Desdobramentos desta natureza são característicos de isomeria *cis* onde, neste caso, os átomos de cloro estão na posição *cis* ao átomo de Sn e provavelmente *trans* aos átomos de oxigênio. A figura 12 abaixo apresenta uma possível estrutura para o complexo $[\text{SnCl}_2\text{Ph}_2\text{Rut.}]2\text{H}_2\text{O}$.

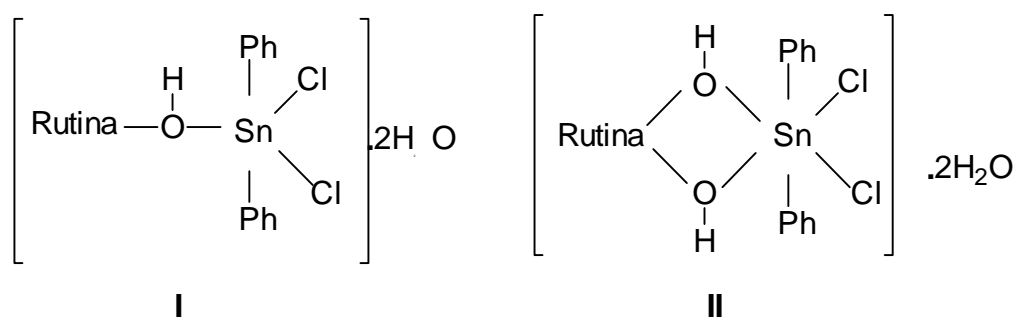


Figura 12-Possíveis estruturas para o complexo $[\text{SnCl}_2\text{Ph}_2\text{Rut.}]2\text{H}_2\text{O}$

Nos compostos $[\text{SnClPh}_3(\text{Rut})].6 \text{H}_2\text{O}$, $[\text{SnClPh}(\text{Rut})].\text{H}_2\text{O}$, $[\text{SnCl}(\text{Rut})].\text{H}_2\text{O}$ não foi observado desdobramento da feição espectral em baixa frequência, porém observou-se absorções em 231, 232 e 228 cm^{-1} , respectivamente. Esta única banda em baixa frequência sugere, no mínimo duas possibilidades para a ligação Sn-Cl. A primeira, o átomo de cloro trans ao átomo de oxigênio (estrutura III, Fig 13) ou trans ao grupo fenila. Neste caso, a rutina estaria coordenada via modo bidentado, podendo ainda coordena-se via modo monodentado (estrutura IV, Fig 13). Geralmente compostos que apresentam átomos de cloro na posição trans a átomos mais eletronegativos, como o de oxigênio, vão exibir em seus espectros de infravermelho absorções do estiramento da ligação metal-cloro em frequência acima de 200 cm^{-1} .

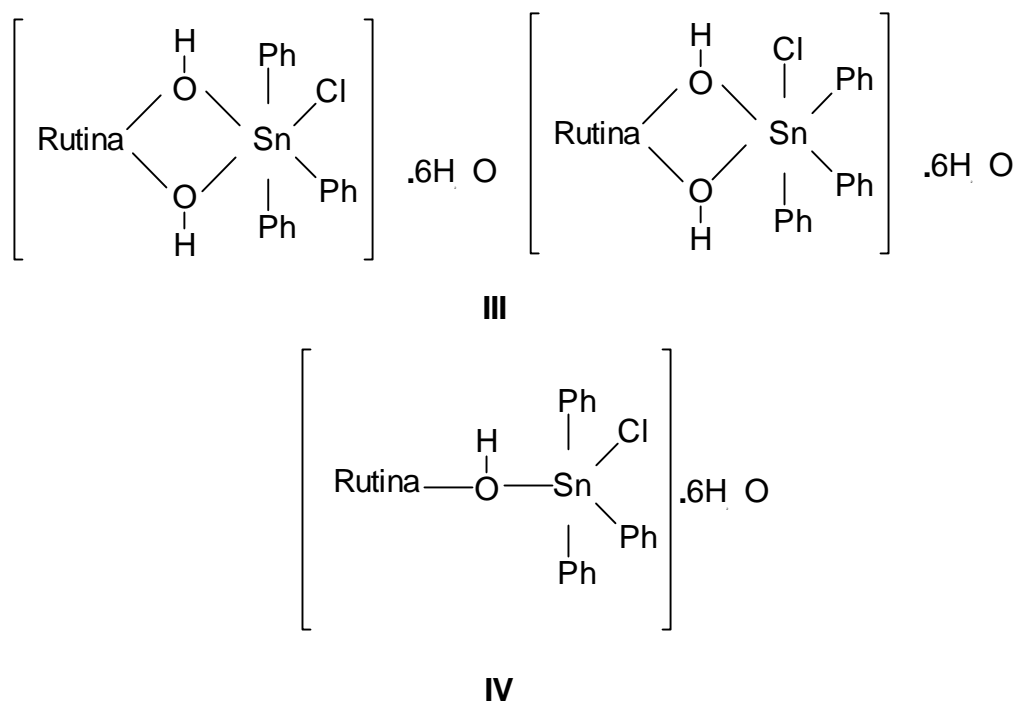


Figura 13-Possíveis estruturas para o composto $[\text{SnClPh}_3(\text{Rut})].6 \text{H}_2\text{O}$

A literatura descreve estiramentos característicos da ligação Sn-Cl de compostos como $[(\text{Me}_2\text{SnCl}_2)_2\text{bip}]$ (bip=2,2'bipirimidina), $[(\text{Et}_2\text{SnCl}_2)_2\text{bip}]$, $[\text{Et}_2\text{SnCl}_2\text{bip}]$, $[\text{Et}_2\text{SnCl}_2\text{bip.bip}]$ na faixa de 240 a 280 cm^{-1} (CARUSO et al, 1996).

A figura 14 mostra duas estruturas compatíveis com os resultados apresentados até o momento para o complexo derivado do reagente $[\text{SnCl}_3\text{Ph}]$.

Na estrutura V, o estanho tem um numero de coordenação igual a 4 e simetria tetraédrica. Na estrutura VI tem simetria de uma bipiramide trigonal.

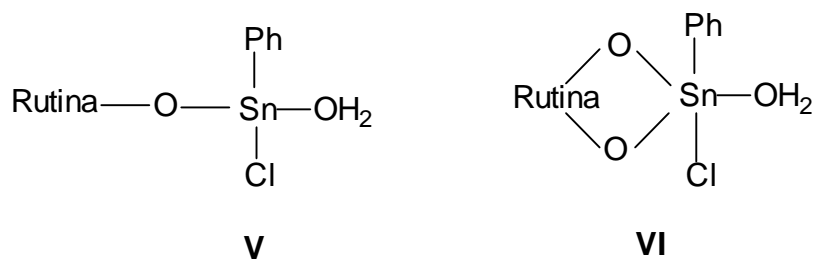


Figura 14-Possíveis estruturas para os compostos $[\text{SnClPh}(\text{Rut})\cdot\text{H}_2\text{O}]$

Uma possível estrutura para o composto $[\text{SnClRut}(\text{H}_2\text{O})]$ é mostrado na figura 15 abaixo, onde os átomos de cloro formam uma ligação Sn-Cl intermolecular de pseudohalogênio.

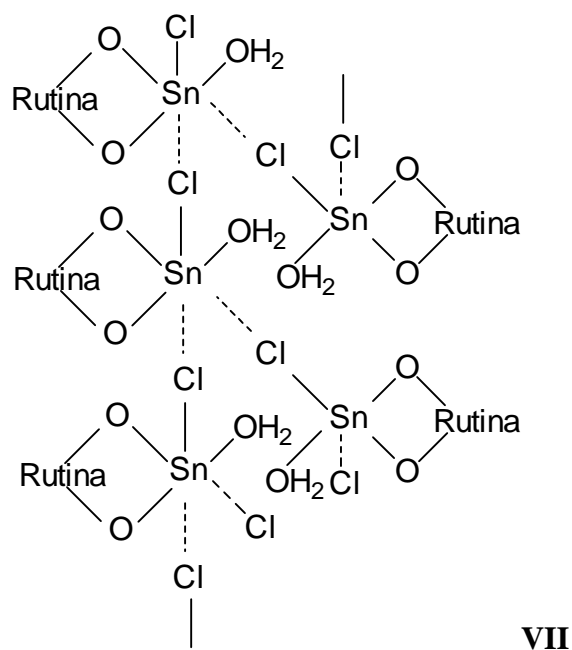


Figura 15- Possível estrutura do composto $[\text{SnClRutH}_2\text{O}]$

4.1.3- Análise de RMN de Sn¹¹⁹

Os compostos sintetizados foram submetidos a análise de ressonância magnética de Sn¹¹⁹. Esta técnica nos oferece informações sobre a presença do átomo de estanho na molécula bem como a geometria apresentada por estes compostos.

O deslocamento químico do Sn¹¹⁹ pode ser influenciado por vários fatores como o número de coordenação, efeitos de substituintes e múltiplas substituições, temperatura e o efeito isotópico (WRACKMEYER B., 1985).

4.1.3.1-Número da coordenação

O deslocamento significativo do sinal de ressonância do átomo de ¹¹⁹Sn para baixa frequência revela que uma mudança na simetria do composto em questão. Por exemplo, para um composto supostamente tetraédrico o aumento de seu número de coordenação assumindo uma estrutura trigonal-piramidal ou octaédrica acarretará no deslocamento do sinal de ¹¹⁹Sn para baixa frequência. Isto ocorre em razão do aumento da densidade eletrônica sobre o átomo de estanho. Entretanto, é importante ressaltar o comportamento destes compostos em solução, com interações do tipo soluto\solvente, autoassociação e/ou coordenação intramolecular.

Há, naturalmente, outros fatores a serem considerados além do número e coordenação. Estes são relacionados principalmente à presença de estados excitados e à carga nuclear efetiva no átomo de estanho.

4.1.3.2-Efeitos do substituinte e substituição múltipla

A proteção do núcleo de Sn é afetada significativamente pelo número de substituintes presentes e por suas propriedades estéricas e eletrônicas. Muito freqüentemente uma comparação direta dos efeitos dos substituintes é dificultada devido a presença de grupos volumosos, ligados ao Sn como átomos volumosos que possam estar presentes nos substituintes. A presença de grupos volumosos em compostos de coordenação com Sn deve ser

previamente analisada uma vez que estes podem impedir a autoassociação, por exemplo. alcóxidos e fluoretos. Uma comparação dos valores de $\delta^{119}\text{Sn}$ revela que não existe nenhum relacionamento óbvio geral entre $\delta^{119}\text{Sn}$ e $\delta^{119}\text{Sn}$ com qualquer outro parâmetro empírico. Em vez disso, um número de influências devem ser consideradas, como a eletronegatividade, energias da excitação e contribuições de átomos vizinhos, (que é gerada pela presença dos substituintes). Ao que parece, a avaliação de contribuições vizinhas constitui um problema sério para a interpretação dos deslocamentos químicos de ^{119}Sn .

Hoje, muitos valores de $\delta^{119}\text{Sn}$ com diversos grupos substituintes encontram-se tabelados. Os espectros de ^{119}Sn podem ser utilizados para indicar a pureza de um composto de coordenação com Sn bem como investigar o equilíbrio deste com a outra espécie em solução e, naturalmente, suas propriedades dinâmicas em geral. Assim existe uma grande escala de deslocamentos químicos de Sn, uma vez que a técnica de ressonância magnética tem sido muito utilizada como uma ferramenta de caracterização de espécies químicas na atualidade.

4.1.3.3-Dependência da temperatura

Em conseqüência da autoassociação ou das interações com solventes, a proteção do núcleo do átomo de Sn vai depender muito da temperatura.

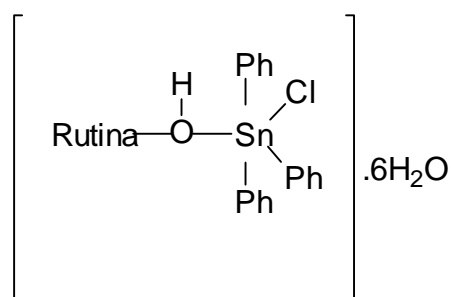
Na ausência destes, efeitos de proteção nuclear depende basicamente da rotação, da vibração, das interações eletrostáticas entre solvente e soluto, e dos equilíbrios conformacionais dentro do composto. Tem sido observado que a blindagem do ^{119}Sn aumenta de maneira aproximada, linearmente com temperatura. A interdependência depende muito do tipo de composto e, possivelmente do solvente usado.

4.1.3.4- Efeitos de Isótopos

A diferença observada entre deslocamentos de ^{119}Sn e ^{117}Sn pode ser com segurança negligenciado. Entretanto, nenhum estudo sistemático recente neste assunto foi realizado. O efeito de isômeros pode se tornar insignificante

se outros fatores como a influência do solvente e mudança temperatura, forem considerados. Já o efeito de ^{12}C e ^{13}C em organoestânicos depende da natureza dos substituintes. A substituição isotópica por átomos mais pesados desloca o sinal de $\delta^{119}\text{Sn}$ para baixa frequência ocorrendo o contrário com o sinal de ^{13}C .

De acordo com a tabela 7 a análise dos espectros de ressonância magnética de ^{119}Sn revelou que o composto $[\text{SnClPh}_3(\text{Rut}).6\text{H}_2\text{O}]$ apresenta um deslocamento químico característico de moléculas pentacoordenadas. Este resultado sugere que o átomo de estanho neste composto esteja ligado apenas a uma das hidroxilas axiais da molécula de rutina, atuando, portanto, como um ligante monodentado. A figura 16 apresenta a possível estrutura do composto $[\text{SnClPh}_3(\text{Rut}).6\text{H}_2\text{O}]$.



VIII

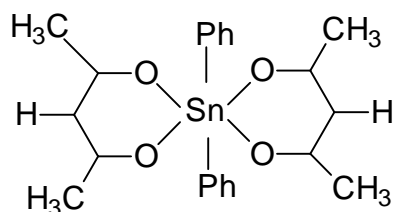
Figura 16 estrutura provável do composto $[\text{SnClPh}_3(\text{Rut}).6\text{H}_2\text{O}]$

Tabela 7-Deslocamentos químicos de ^{119}Sn dos complexos do flavonóide rutina

| Compostos | $\delta^{119}\text{Sn}$ (ppm) | $\delta^{119}\text{Sn}$ (ppm) |
|---|-------------------------------|---|
| $[\text{SnCl}_2\text{Ph}_2(\text{Rut})].\text{H}_2\text{O}$ | -534; -546 | -150,00 (SnCl_2Ph_2) |
| $[\text{SnClPh}_3(\text{Rut})].6\text{H}_2\text{O}$ | -186 | -163,00 (SnClPh_3) |
| $[\text{SnClPh}(\text{Rut})].\text{H}_2\text{O}$ | -534; - 546; - 572 | -32,00 (SnCl_3Ph) |
| $[\text{SnCl}(\text{Rut})].\text{H}_2\text{O}$ | -546; -622 | -150,00 (SnCl_4) |

Os compostos $[\text{SnCl}_2\text{Ph}_2(\text{Rut})].\text{H}_2\text{O}$, $[\text{SnClPh}(\text{Rut})\text{H}_2\text{O}]$ e $[\text{SnCl}(\text{Rut}).\text{H}_2\text{O}]$ apresentam deslocamentos químicos característicos de estanho hexacoordenado. A literatura descreve compostos hexacoordenados do tipo $[\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{acac})_2]$ que apresentam deslocamentos de ^{119}Sn em frequência mais baixa (514 ppm) cuja estrutura (Figura 17) é bem similar a sugerida para os compostos sintetizados. Neste trabalho estes compostos apresentam uma disposição de carga similar a ressonância observada na região do anel aromático presente na rutina.

Uma possibilidade de coordenação da rutina ao estanho, via modo bidentado deve envolver as hidroxilas 3' e 4' (Figura 18) formando assim ligações Sn-O com força de ligação variável, em função do caráter ácido do estanho. Em consequência disto, haverá perda de HCl o que demonstra a análise elementar para alguns compostos.



IX

Figura 17-Estrutura do composto $\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{acac})_2$

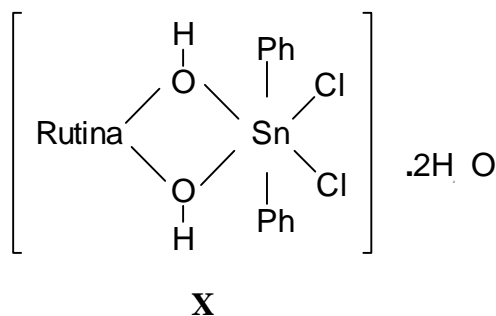


Figura 18-Possível estrutura do composto $[\text{SnCl}_2\text{Ph}_2(\text{Rut})]\cdot\text{H}_2\text{O}$

Os compostos $[\text{SnClPh}(\text{Rut})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{SnCl}(\text{Rut})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ apresentaram mais de um deslocamento químico de ^{119}Sn em seus espectros. Uma possível explicação para este fato seria a formação de no mínimo, duas espécies químicas de estanho hexacoordenado no estado sólido. Quando em solução os sinais das espécies estariam em evidência. Outra possibilidade consiste na formação de estruturas poliméricas, via ligação de pseudohalogênio (Figura 19 e 20), no estado sólido. Quando em solução, espécies monoméricas são formadas e, portanto, vários sinais de ^{119}Sn são observados.

Um exemplo clássico deste compostos de estanho poliméricos consiste no SnPh_3Cl onde os átomos de cloro formam espécies com o estanho em ponte. As espécies monoméricas são obtidas de reações com aminas, entre outros ligantes (FILGUEIRAS, C. A., 1982).

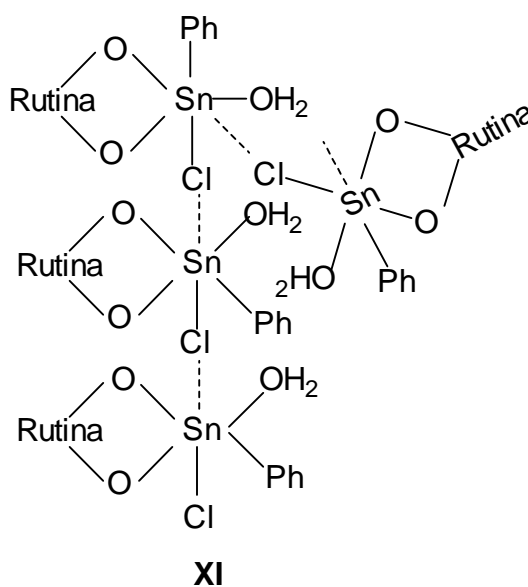


Figura 19-Estrutura proposta para o composto $[\text{SnClPh}(\text{Rut})]\cdot\text{H}_2\text{O}$

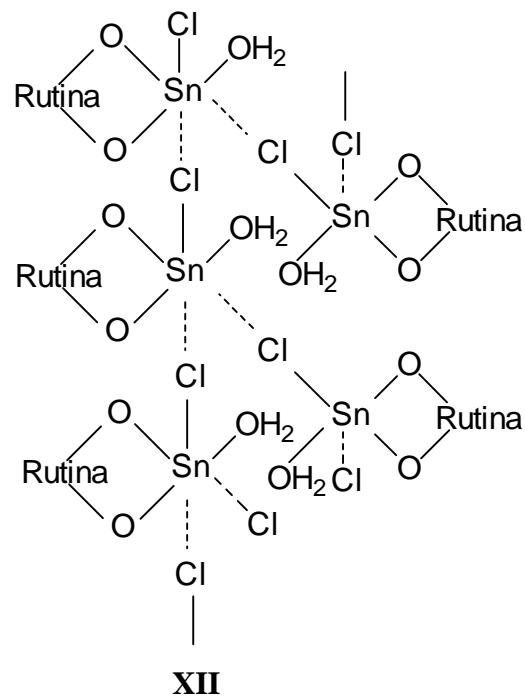


Figura 20-Estrutura proposta para o composto $[\text{SnCl}(\text{Rut})]\cdot\text{H}_2\text{O}$

4.2- Primeiro ensaio biológico com duração de 30 dias. Efeito hipolipidêmico dos complexos do Flavonóide rutina com organoestânicos

O primeiro experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, no esquema em parcelas subdivididas, em que as parcelas foram constituídas por oito grupos,: G1= ração, G2= ração + ácido cólico + colesterol (RCAC), G3= RCAC + rutina, G4 = RCAC + SN1, G5 = RCAC + SN2, G6 = RCAC + SN3, G7 = RCAC + SN4 e G8 = RCAC + medicamento e as subparcelas, por três tempos de avaliação (0, 15 e 30 dias). Cada grupo apresentava 6 repetições.

Os dados de colesterol total, triacilgliceróis, HDL e LDL foram submetidos à análise de variância e teste F a 5% e 1% de probabilidade.

O efeito do tempo foi estudado por meio do teste F ($P < 0,05$). As dietas-controle foram comparadas entre si pelo teste F ($P < 0,05$) enquanto as dietas, onde os coelhos foram tratados com substâncias em estudo (D3 a D8) foram comparadas entre si por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade. A comparação com as dietas-controle G1 (ração) e G2 (grupo hipercolesterolemico) com as demais dietas (G3 a G8) foi efetuada pelo teste de Dunett ($P < 0,05$).

Quadro 1 – Valores médios de colesterol total séricos, em mg/dL, de coelhos machos tratados com ração + substancia teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | Colesterol total (mg/dL) | % de variação | |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------|----------|
| | | | Ração | RCAC |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 151,27 A | . | . |
| | G ₂ R + (RCAC) | 128,82 A | -14,84 | . |
| | G ₃ RCAC + rutina | 134,23 a | -11,26 | +4,20 |
| | G ₄ RCAC + SN1 | 163,53 a | +8,10 | +26,94 |
| | G ₅ RCAC + SN2 | 140,10 a | -7,38 | +8,76 |
| | G ₆ RCAC + SN3 | 124,45 a | -17,73 | -3,39 |
| | G ₇ RCAC + SN4 | 172,23 a | +13,86 | +33,70 |
| | G ₈ RCAC + medicamento | 169,60 a | +12,12 | +31,66 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 99,20 B | . | . |
| | G ₂ R + (RCAC) | 1.012,22 A | +920,38 * | . |
| | G ₃ RCAC + rutina | 986,70 a | +894,66 * | -2,52 |
| | G ₄ RCAC + SN1 | 751,95 ab | +658,01 * | -25,71 * |
| | G ₅ RCAC + SN2 | 900,66 ab | +807,92 * | -11,02 |
| | G ₆ RCAC + SN3 | 788,65 ab | +695,01 * | -22,09 * |
| | G ₇ RCAC + SN4 | 633,07 b | +538,18 * | -37,46 * |
| | G ₈ RCAC + medicamento | 615,84 b | +520,81 * | -39,16 * |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 137,33 B | . | . |
| | G ₂ R + (RCAC) | 1.965,20 A | +1331,01 * | . |
| | G ₃ RCAC + rutina | 1.512,17 a | +1001,12 * | -23,05 * |
| | G ₄ RCAC + SN1 | 1.342,00 a | +877,21 * | -31,71 * |
| | G ₅ RCAC + SN2 | 1.476,20 a | +974,93 * | -24,88 * |
| | G ₆ RCAC + SN3 | 1.414,50 a | +930,00 * | -28,02 * |
| | G ₇ RCAC + SN4 | 1.325,50 a | +865,19 * | -32,55 * |
| | G ₈ RCAC + medicamento | 1.318,50 a | +860,10 * | -32,91 * |

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

* Estatisticamente diferente da dieta-controle pelo teste de Dunnett (P<0,05).

No quadro 1 foram analisadas as concentrações de colesterol-total, apresentando a descrição dos resultados estatísticos das 8 dietas diferentes administradas durante todo o período de experimento.

A dosagem no tempo zero revelou que todos os coelhos apresentaram valores de colesterol próximos a normalidade. Este resultado mostra que a homogeneidade entre os animais foi estabelecida antes que fosse iniciado o tratamento.

A indução da hipercolesterolemia foi observada durante as dosagens referentes aos 15 dias e 30 dias de tratamento. Estes resultados foram confirmados a partir da análise do grupo 1 onde foi utilizado somente Ração e do grupo 2 onde foi administrado ração, colesterol (0,5%) e ácido cólico (0,1%). Observou-se que a concentração de colesterol-total do grupo 2 apresentou um aumento de 920,38% aos 15 dias e 1331,01% aos 30 dias quando comparado ao grupo 1 controle.

Na dosagem de 15 dias as dietas onde os compostos SN1, SN2, SN3, SN4 e o medicamento atorvastatina cálcica foram usados em cada grupo isoladamente se diferiram dos grupos controle ração e grupo controle ração +colesterol+ ácido cólico. Resultados estatisticamente significativos foram observados somente nas dietas onde foram utilizados os complexos SN1, SN3, SN4 e o princípio ativo atorvastatina cálcica. Aos 30 dias podemos observar resultados estaticamente significativos para todos tratamentos, incluindo, como não havia sido citado anteriormente, o flavonóide rutina isoladamente bem como o complexo SN2.

O princípio ativo atorvastatina cálcica, presente no medicamento Líptor utilizado durante o experimento, e o complexo SN4 apresentaram as melhores taxas de redução, sendo aos 15 dias de -39,16% e -37,46% e os 30 dias de -32,55% e -32,91%, respectivamente. Estes resultados apresentam grande importância uma vez que o complexo SN4 apresenta efeito biológico similar ao medicamento, comprovando assim sua eficácia.

Flavonóides tem revelado, em diversos estudos, a capacidade de promover o aumento da atividade de receptores de LDL nos hepatócitos e conseqüentemente um aumento de sua endocitose, uma vez que o transporte de colesterol do fígado para os tecidos periféricos é efetuado pela lipoproteína

colesterol-LDL. Esta propriedade vai explicar a redução dos níveis sanguíneos de colesterol total que ocorreu neste estudo (KIRK et al., 1998).

Outro mecanismo de ação dos flavonóides que a complexação pode ter influenciado de forma benéfica é o efeito vasodilatador e diurético. A excreção do colesterol bem como dos ácidos biliares se faz preferencialmente pela bile, porém observa-se que parte destas substâncias também é excretada pelos rins. Uma vez que o flavonóide possua um efeito vasodilatador e diurético este poderá promover uma maior excreção de colesterol pela urina e diminuir assim seus níveis plasmáticos (POURRAT et al., 1967).

Estudos com flavonóides têm revelado que estes compostos são capazes de inibir a peroxidase lipídica tanto em sistemas enzimáticos (enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico) bem como não enzimáticas (exemplo em sistema ácido ascórbico- Fe^{+2}).

O ácido araquidônico é um importante ácido graxo insaturado precursor de prostaglandinas prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos, sendo todos estes compostos potentes mediadores intracelulares que controlam uma variedade de complexos no organismo. A enzima prostaglandina endoperoxidase sintetase formada por um complexo enzimático que lhe atribui tanto atividade ciclooxigenase como peroxidase, é responsável pela conversão do ácido araquidônico há PGG_2 (atividade ciclooxigenase) e a produção de PGH_2 a partir de PGG_2 (atividade peroxidase). Nesta última interconversão, a atividade das peroxidases promove a liberação de radicais livres os quais dão a formação de oxigênio reativo e a peroxidação lipídica patológica (GALVEZ, 1995).

Os flavonóides podem atuar também no aumento da atividade da LCAT (lecitina colesterol acil transferase) que está presente na superfície dos HDL, convertendo o colesterol presentes em quilomícrons, VLDL, LDL e tecidos periféricos em ésteres de colesterol e assim tornando mais eficaz o transporte destes para o fígado para serem metabolizados (SUDHEESH et al., 1997).

Os flavonóides rutina e quercetina foram capazes de solubilizar plaquetas no tecido endotelial da aorta de coelhos, prevenindo a agregação plaquetária e reduzindo a síntese de colágeno no processo. Esse mecanismo de ação dos flavonóides está associado ao fato destes compostos serem

capazes de se ligar a radicais livres, aumentar a síntese de prostaciclina (compostos que possuem ação vasodilatadora) (GRYGLEWSKI et al., 1987).

A secreção de ésteres de colesterol presentes na lipoproteína VLDL aumenta em células de fígado de ratos com alta atividade da enzima colesterol acil transferase. Em contraste, a secreção de VLDL é suprimida quando o colesterol hepático é reduzido. Então, a atividade dessa enzima tem um papel predominante em manter a homeostase do colesterol, sendo este um determinante importante no nível de colesterol sérico. A elevação na concentração do nível de colesterol é conhecida por aumentar o risco de doenças cardiovasculares. Este estudo revela também que flavonóides impedem a formação de maiores quantidades de LDL. Percebe-se, então, que diminuindo a formação de ésteres de colesterol no fígado, pela inibição da enzima colesterol acil transferase por flavonóides pode-se prevenir estas doenças e explicar mais um mecanismo, de ação de flavonóides sobre enzimas envolvidas no metabolismo lipídico (YOTSUMOTO et al., 1997).

KELLIS e VICKERY, 1984 pesquisaram o efeito de flavonóides sobre a estrogênio sintetase citocromo P-450, enzima responsável pela catálise da reação de conversão de andrógeno para estrogênio. Diversos flavonóides têm ação inibidora sobre a aromatização de androstenediona para estradiol. Segundo estes pesquisadores, os flavonóides podem competir com os esteróides e sua interação com certas monoxigenases alteram o metabolismo dos hormônios esteroidais. Esta ação é considerada de grande importância visto que os glicocorticóides aumentam a taxa de mobilização de gordura a partir do aumento da permeabilidade da membrana celular. Este mecanismo de ação evidencia mais um papel dos flavonóides e a complexação efetuada entre estes compostos com organoestênicos possivelmente influenciou a atividade destas enzimas, uma vez que muitas enzimas apresentam uma interação expressiva com metais (como por exemplo, diversos cofatores enzimáticos que são metais).

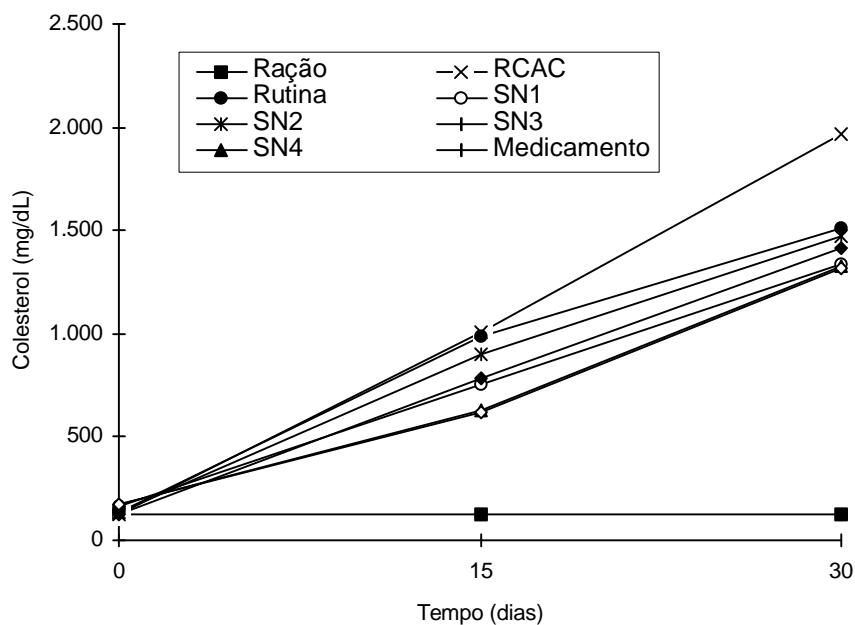


Figura 21 – Colesterol médio, em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas, em função do tempo.

A figura 21 mostra que os grupos que receberam os compostos SN1, SN2, SN3, SN4, Atorvastatina cálcica e Rutina apresentaram resultados estatisticamente significativos. As concentrações de colesterol apresentadas pelos grupos em que os compostos SN1, SN2, SN3, SN4, Atorvastatina cálcica e Rutina isoladamente foram administrados foram menores aos 15 e 30 dias quando comparadas ao grupo controle 2 que recebeu somente ração+colesterol 0,5% e ácido cólico 0,1%. Isto indica que as substâncias tiveram um efeito hipolipidêmico.

Quadro 2 – Valores médios de Triacilgliceróis séricos, em mg/dL, de coelhos machos tratados com ração + substâncias testes em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | Triacilgliceróis (mg/dL) | % de variação | |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------|--------|
| | | | Ração | RCAC |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 87,92 A | . | . |
| | G ₂ R + (RCAC) | 85,62 A | -2,62 | . |
| | G ₃ RCAC + rotina | 74,32 a | -15,47 | -13,20 |
| | G ₄ RCAC + SN1 | 116,78 a | +32,83 | +36,39 |
| | G ₅ RCAC + SN2 | 65,82 a | -25,14 | -23,13 |
| | G ₆ RCAC + SN3 | 107,17 a | +21,89 | +25,17 |
| | G ₇ RCAC + SN4 | 110,12 a | +25,25 | +28,61 |
| | G ₈ RCAC + medicamento | 111,38 a | +26,68 | +30,09 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 72,57 A | . | . |
| | G ₂ R + (RCAC) | 87,96 A | +21,21 | . |
| | G ₃ RCAC + rotina | 100,88 a | +39,01 | +14,69 |
| | G ₄ RCAC + SN1 | 87,76 a | +20,93 | -0,23 |
| | G ₅ RCAC + SN2 | 57,65 a | -20,56 | -34,46 |
| | G ₆ RCAC + SN3 | 67,27 a | -7,30 | -23,52 |
| | G ₇ RCAC + SN4 | 60,78 a | -16,25 | -30,90 |
| | G ₈ RCAC + medicamento | 59,40 a | -18,15 | -32,47 |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 87,95 A | . | . |
| | G ₂ R + (RCAC) | 112,14 A | +27,50 | . |
| | G ₃ RCAC + rotina | 88,70 a | +0,85 | -20,90 |
| | G ₄ RCAC + SN1 | 88,16 a | +0,24 | -21,38 |
| | G ₅ RCAC + SN2 | 75,90 a | -13,70 | -32,32 |
| | G ₆ RCAC + SN3 | 117,78 a | +33,92 | +5,03 |
| | G ₇ RCAC + SN4 | 105,26 a | +19,68 | -6,14 |
| | G ₈ RCAC + medicamento | 91,40 a | +3,92 | -18,49 |

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05)

.Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

* Estatisticamente diferente da dieta-controle pelo teste de Dunnett (P<0,05).

No quadro 2 foram analisadas o efeito das substâncias-testes sobre a concentração de triacilglicerol sérico apresentando a descrição resultados estatísticos das 8 dietas diferentes administradas durante todo o período de experimento.

A dosagem no tempo zero revelou que todos os coelhos apresentaram valores de triacilgliceróis próximos a normalidade. Este resultado mostra que a homogeneidade entre os animais foi estabelecida antes que fosse iniciado o tratamento.

A indução da hipertrigliceridemia não foi estatisticamente significativa durante o período do experimento. Estes resultados foram obtidos a partir da comparação entre o grupo 1 controle onde foi somente administrado a ração e o grupo 2 onde foi administrado ração + colesterol+ ácido cólico, sugerindo assim possíveis ajustes no tratamento que visa a indução do aumento dos índices deste parâmetro. Neste estudo utilizou-se colesterol 0,5% e ácido cólico 0,1%. Possivelmente a concentração de colesterol não foi suficiente para induzir a hipertrigliceridemia. Estudos realizados por Lima 2001, mostraram que colesterol a 1% e ácido cólico a 0,5% foram capazes de elevar a concentração de triacilgliceróis de $113,78 \pm 19,52$ para $266,72 \pm 60,96$.

Na dosagem realizada aos 15 dias de experimento nenhum dos grupos apresentaram resultados estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05\%$) apesar da melhor taxa de variação a ser apresentada pelo o complexo SN2 (-34,46%). Aos 30 dias este mesmo perfil foi observado revelando a não diferenciação estatística entre a dietas pelo teste de Tukey apesar do composto SN2 exercer a taxa de -32,32%. Este resultado é considerável, quando é levado em conta o aspecto fisiológico.

Diversos experimentos com a utilização de flavonóides têm exercido um efeito hipotrigliceridêmico. Uma das possíveis explicações seria um aumento na atividade da enzima lípase. O flavonóide Rutina teve seu efeito hipotrigliceridêmico comprovado em diversos trabalhos nos quais foi relatada sua capacidade de potencializar a atividade da lípase. Esta enzima hidrolisa os triacilgliceróis ocasionando uma maior mobilização dos ácidos graxos sanguíneos para o fígado, o tecido muscular e o tecido adiposo (GOMES, 1998; LIMA, 1999).

A eficiência do medicamento liptor no qual esta presente o princípio ativo atorvastatina cálcica, apresenta uma redução do colesterol-total e suas frações, maior do que quando aplicado a redução de triacilgliceróis. Uma pesquisa realizada com dosagens de 10 a 80 mg deste princípio ativo revelou a redução de 19 a 37 % nos níveis de triacilgliceróis enquanto esta mesma faixa de dosagem revelou uma redução de 39 a 60% nos índices de colesterol total e suas frações. Estes resultados estatísticos demonstram que a complexação do flavonóide rutina com organoestânicos não promoveu um aumento na redução na concentração de triacilgliceróis (AVERT, 1998).

É importante ressaltar que os medicamentos pertencentes a classe das estatinas como as provastatina, lovastatina, sinvastatina bem como o a atorvastina cálcica têm um efeito mais pronunciado sobre as concentrações de colesterol. Estes compostos atuam na inibição da atividade da β -hidroximetilglutaril C α . Estudos revelam que flavonóides também podem inibir esta enzima. Os medicamentos mais utilizados no controle dos triacilgliceróis são os fibratos como o benzofibrato, genfibrozil, fenofibrato e ciprofibrato (GOODMAN, 1996).

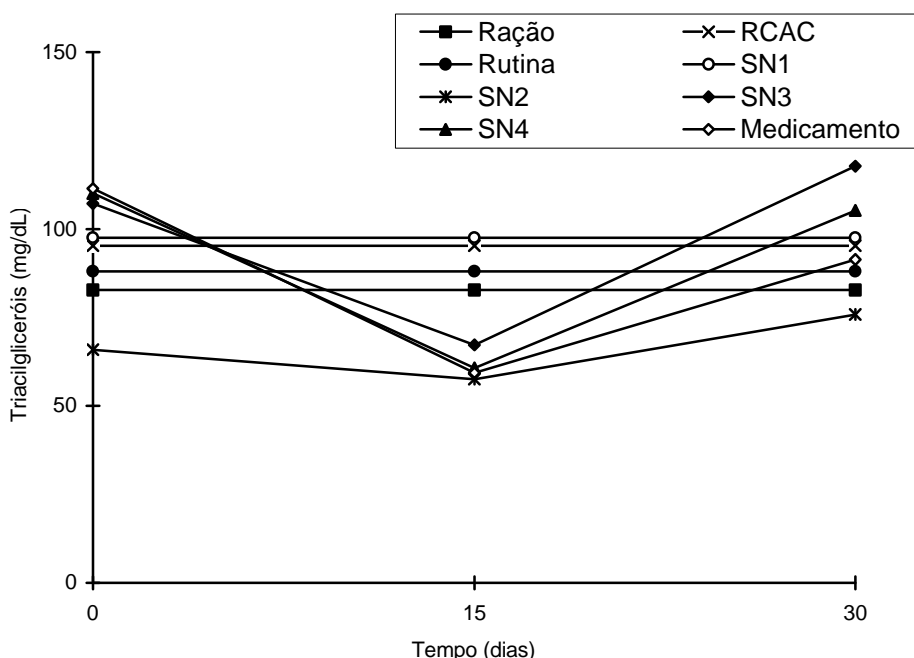


Figura 22 – Triacilglicerol médio, em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas, em função do tempo.

A figura 22 mostra que os grupos que receberam os compostos SN2, SN3, SN4 e a atorvastatina cálcica apresentaram valores de triacilgliceróis estatisticamente significativos quanto ao tempo. Todos estes grupos apresentaram uma redução na concentração de triacilgliceróis aos 15 dias e um aumento deste constituinte aos 30 dias. Observou-se que as substâncias tiveram melhor efeito hipocolesterolêmico do que hipotrigliceridêmico. Normalmente entre os medicamentos utilizados, os da linha vastatinas têm melhor efeito na redução de colesterol e os fibratos na redução dos triacilgliceróis.

Quadro 3 – Valores médios de HDL, em mg/dL, em coelhos machos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | HDL (mg/dL) | % de variação | |
|-----------------|-----------------------------------|----------------|---------------|----------|
| | | | Ração | RCAC |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 56,59 A | . | . |
| | G ₂ R + (RCAC) | 62,64 A | +10,69 | . |
| | G ₃ RCAC + rotina | 40,59 a | -28,27 | -35,20 |
| | G ₄ RCAC + SN1 | 57,38 a | +1,40 | -8,40 |
| | G ₅ RCAC + SN2 | 53,41 a | -5,62 | -14,73 |
| | G ₆ RCAC + SN3 | 42,61 a | -24,70 | -31,98 |
| | G ₇ RCAC + SN4 | 68,77 a | +21,52 | +9,79 |
| | G ₈ RCAC + medicamento | 64,05 a | +13,18 | +2,25 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 42,70 B | . | . |
| | G ₂ R + (RCAC) | 92,22 A | +115,97 * | . |
| | G ₃ RCAC + rotina | 169,00 a | +295,78 * | +83,26 * |
| | G ₄ RCAC + SN1 | 113,71 abc | +166,30 * | +23,30 |
| | G ₅ RCAC + SN2 | 153,62 a | +259,77 * | +66,58 * |
| | G ₆ RCAC + SN3 | 132,56 ab | +210,44 * | +43,74 * |
| | G ₇ RCAC + SN4 | 87,33 bc | +104,52 * | -5,30 |
| | G ₈ RCAC + medicamento | 57,98 c | +35,78 | -37,13 |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 18,52 B | . | . |
| | G ₂ R + (RCAC) | 95,52 A | +415,77 * | . |
| | G ₃ RCAC + rotina | 116,53 a | +529,21 * | +22,00 |
| | G ₄ RCAC + SN1 | 111,43 a | +501,67 * | +16,66 |
| | G ₅ RCAC + SN2 | 106,48 a | +474,95 * | +11,47 |
| | G ₆ RCAC + SN3 | 104,36 a | +463,50 * | +9,25 |
| | G ₇ RCAC + SN4 | 124,57 a | +572,62 * | +30,41 |
| | G ₈ RCAC + medicamento | 156,72 a | +746,22 * | +64,07 * |

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

* Estatisticamente diferente da dieta-controle pelo teste de Dunnett (P<0,05).

No quadro 3 foram analisadas as concentrações de colesterol-HDL apresentando a descrição dos resultados estatísticos das 8 dietas diferentes administradas durante todo o período experimental.

A dosagem no tempo zero revelou que todos os coelhos apresentaram valores de colesterol-HDL próximos a normalidade. Este resultado mostra que a homogeneidade entre os animais foi estabelecida antes que fosse iniciado o tratamento.

A indução da elevação da concentração de colesterol-HDL foi observada durante as dosagens de 15 dias e 30 dias a partir da análise do grupo 1 onde foi utilizado somente ração e do grupo 2 onde foi administrado ração, colesterol (0,5%) e ácido cólico (0,1%).

Na dosagem aos 15 dias resultados estatisticamente significativos foram observados nos grupos 3, 5 e 6. No grupo 3, onde foi utilizado o flavonóide rutina isoladamente, uma taxa de aumento desta lipoproteína de 83,26% foi observada. No grupo 5 onde foi administrado o composto SN2, a taxa de elevação desta lipoproteína foi de 66,58%. No grupo 6 onde o composto SN3 foi utilizado a taxa de elevação desta lipoproteína foi de 43,74%. Aos 30 dias o grupo que apresentou resultados estatisticamente significativos e paralelamente a melhor taxa de elevação desta lipoproteína de 64,07% foi o grupo 8 onde foi administrado o princípio ativo atorvastatina cálcica.

A oxidação aterogênica de LDL estimula o acúmulo de colesterol em macrófagos, gerando assim efeitos aterogênicos no sangue e nas células da parede arterial. Deste modo a remoção de LDL oxidado para o plasma ou para o espaço extracelular pelas células da parede arterial pode ser benéfica uma vez que evitará o acúmulo de colesterol e a formação de células espumosas. Outros mecanismos que podem contribuir para a eliminação do LDL oxidado aterogênico seriam o balanço entre a quantidade de LDL e sua associação com pro e antioxidantes. O HDL plasmático foi previamente apresentado como inibidor da oxidação do LDL. O mecanismo da propriedade inibitória desta lipoproteína não foi bem elucidado. Sugeriu-se que a apolipoproteína humana possua propriedade que possa afetar a peroxidação lipídica do LDL.

Uma possibilidade adicional para o efeito inibitório do HDL na oxidação do LDL é a presença da enzima paraoxonase (PON) no HDL plasmático. A atividade da PON sérica apresentou-se menor em pacientes com

aterosclerose, pacientes que sofreram infarto do miocárdio, pacientes com hipercolesterolemia familiar e pacientes com diabetes mellitus. Embora os mecanismos fisiopatológicos exercidos por esta enzima não sejam bem conhecidos, existem evidências de que ocorre um efeito protetor da PON contra lesões oxidativas.

O consumo de flavonóides por animais de laboratório aumentou a atividade da paraoxinase em até 75% em comparação aos animais do grupo controle. Estes resultados sugerem que a paraoxinase pode exercer um importante mecanismo para a remoção e eliminação de lipoproteínas oxidadas aterogênicas e assim ser considerada um composto anti-aterogênico (AVIRAM M. e FUHRMAN B., 1998).

O colesterol esterificado pode ser transferido das lipoproteínas de densidade baixa, por exemplo: quilomícrons, VLDL, e LDL, para HDL por meio de uma *proteína transferidora de ésteres de colesterol-CETP* (transporte reverso de colesterol), que é outra proteína do HDL. Assim a proteína permite a transferência dos ésteres de colesterol da HDL para o fígado via quilomícrons remanescentes e VLDL ou via captação das LDL pelo fígado. A HDL pode ser captada diretamente pelo tecido hepático, de tal forma que seu colesterol possa ser eliminado pelas secreções biliares. O sistema LCAT está envolvido na remoção do excesso de colesterol não esterificado das lipoproteínas e dos tecidos. O fígado, e possivelmente o intestino, parecem ser os sítios finais das apolipoproteínas das HDL (GINSBERG, 1994; GRUNDY, 1990; BREWER et al., 1998; BOSTOM et al., 1996; FIELDING et al., 1995).

As concentrações de HDL são inversamente relacionadas com a incidência de aterosclerose coronariana, possivelmente porque refletem a eficiência da remoção de colesterol dos tecidos. (CHEUNG, 1994).

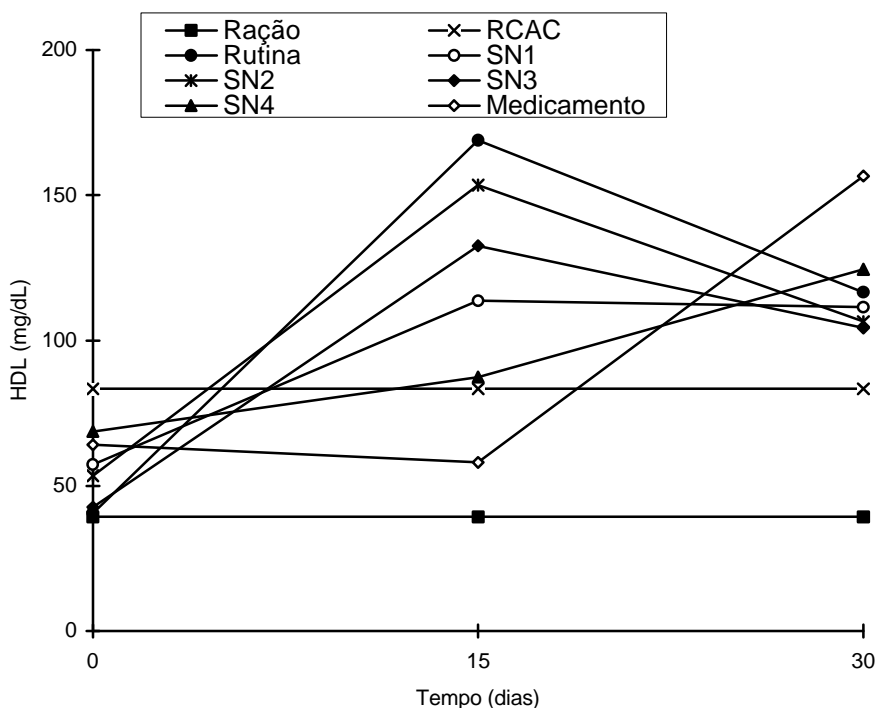


Figura 23 – HDL médio, em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substância-teste em cápsulas em função do tempo.

A figura 23 mostra que as concentrações de colesterol-HDL dos grupos que receberam os compostos Rutina, SN1, SN2, SN3, SN4 e a atorvastatina cálcica apresentaram resultados estatisticamente significativos quanto ao tempo. Os grupos que receberam Rutina, SN1, SN2, SN3 apresentaram um aumento maior desta lipoproteína aos 15 dias e concentrações menores deste parâmetro aos 30 dias. Os grupos que receberam os compostos SN4 e a atorvastatina cálcica apresentaram um aumento crescente desta lipoproteína apresentando maiores concentrações aos 30 dias. Esta lipoproteína transporta o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado onde este será metabolizado, logo este aumento será benéfico para o animal.

Quadro 4 – Valores médios de LDL séricos, em mg/dL, em coelhos machos tratados com ração + substância-teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | LDL (mg/dL) | % de variação | |
|-----------------|-----------------------------------|----------------|---------------|----------|
| | | | Ração | RCAC |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 85,79 A | . | . |
| | G ₂ R + (RCAC) | 60,31 A | -29,90 | . |
| | G ₃ RCAC + rutina | 81,50 a | -5,00 | +35,14 |
| | G ₄ RCAC + SN1 | 84,03 a | -2,05 | +39,33 |
| | G ₅ RCAC + SN2 | 85,66 a | -0,15 | +42,03 |
| | G ₆ RCAC + SN3 | 72,32 a | -15,70 | +19,91 |
| | G ₇ RCAC + SN4 | 103,33 a | +20,45 | +71,33 |
| | G ₈ RCAC + medicamento | 95,95 a | +11,84 | +59,09 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 56,62 B | . | . |
| | G ₂ R + (RCAC) | 869,26 A | +1435,25* | . |
| | G ₃ RCAC + rutina | 740,80 a | +1208,37* | -14,78 |
| | G ₄ RCAC + SN1 | 602,70 a | +964,46* | -30,67 * |
| | G ₅ RCAC + SN2 | 589,22 a | +940,66* | -32,22 * |
| | G ₆ RCAC + SN3 | 603,36 a | +965,63* | -30,59 * |
| | G ₇ RCAC + SN4 | 543,22 a | +859,41* | -37,51 * |
| | G ₈ RCAC + medicamento | 593,35 a | +947,95* | -31,74 * |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 112,43 B | . | . |
| | G ₂ R + (RCAC) | 924,16 A | +721,99 * | . |
| | G ₃ RCAC + rutina | 781,10 bc | +594,74 * | -15,48 * |
| | G ₄ RCAC + SN1 | 880,70 ab | +683,33 * | -4,70 |
| | G ₅ RCAC + SN2 | 649,95 c | +478,09 * | -29,67 * |
| | G ₆ RCAC + SN3 | 1.056,32 a | +839,54 * | +14,30 |
| | G ₇ RCAC + SN4 | 833,69 bc | +641,52 * | -9,79 |
| | G ₈ RCAC + medicamento | 819,41 bc | +628,82 * | -11,33 |

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

* Estatisticamente diferente da dieta-controle pelo teste de Dunnett (P<0,05).

No quadro 4 foram analisadas as concentrações de colesterol-LDL apresentando a descrição dos resultados estatísticos das 8 dietas diferentes administradas durante todo o período de experimento.

A dosagem no tempo zero revelou que todos os coelhos apresentaram valores de colesterol-LDL próximos a normalidade. Este resultado mostra que a homogeneidade entre os animais foi estabelecida antes que fosse iniciado o tratamento.

A indução da elevação dos índices de colesterol-LDL foi observada nas dosagens de 15 e 30 dias a partir da análise do grupo 1 que recebeu somente ração e do grupo 2 ao qual foi administrado ração, colesterol (0,5%) e ácido cólico (0,1%).

Aos 15 dias foi observado pelo teste de Dunnet resultados estatisticamente significativos para os grupos 4, 5, 6, 7, 8 correspondentes a administração dos complexos SN1, SN2, SN3, SN4 e o medicamento atorvastatina cálcica respectivamente. Aos 30 dias somente o grupo 3 e 5 aos quais foram administrados a rotina isoladamente e o complexo SN2 apresentaram os resultados obtidos foram estatisticamente significativos.

A melhor porcentagem de redução desta lipoproteína, aos 15 dias, foi apresentada pelo grupo 7 onde foi administrado o complexo SN4 (-37,51%).

Aos 30 dias foi observado resultados estatisticamente significativos para os grupos 3 e 5. O grupo 3, onde foi utilizado a rotina isoladamente, apresentou uma porcentagem de redução desta lipoproteína de 15,48%. Já no grupo 4 no qual foi administrado o complexo SN2 a porcentagem de redução foi de -29,67%.

Existem muitas evidências epidemiológicas que demonstram uma correlação positiva entre o aumento da lipoproteína colesterol-LDL, concentração de colesterol e aceleração da aterogênese. Em processos iniciais de lesões aterogênicas, as gorduras, os ésteres de colesterol acumulam nos macrófagos para assim formar células espumosas imediatamente abaixo do endotélio vascular. A origem do colesterol que se acumula nos macrófagos é provavelmente proveniente do LDL, paradoxalmente, macrófagos têm poucos receptores de LDL e estes são regulados quando a concentração de LDL se encontra aumentada (MANGIAPANE et al., 1992).

GOLDESTINE et al. foram os primeiros a descrever a modificação química de partículas de LDL, que possibilitaria seu reconhecimento por parte de receptores distintos em macrófagos. Estes receptores que capturam e reconhecem o LDL quimicamente modificado estão sendo isolados. Deste modo, o LDL oxidado é quimioatraído por fatores quioestáticos que atraem os macrófagos, estabelecendo sua deposição na intima, sendo citotóxico no endotélio, quimioatraente para monócitos e rapidamente acumulado por macrófagos presentes no endotélio aórtico in vivo (MANGIAPANE et al., 1992).

Devido a todos os fatores descritos acima uma diminuição nos índices do colesterol-LDL, bem como sua oxidação possibilitaria a redução da lesão aterosclerótica e até mesmo a sua não ocorrência.

Os flavonóides atuam mediante um mecanismo direto protegendo os antioxidantes primários, como o α -tocoferol, e também mediante a captação de radicais livres. Essa ação do flavonóide pode ser efetiva em retardar a aterogênese a partir da diminuição da oxidação das LDLs. Na redução deste constituinte sanguíneo a propriedade antioxidante explica melhor seu mecanismo de ação (PEREIRA W. L., 1999).

Estudos em que mecanismos de ação de flavonóides são analisados mostram que estes compostos também podem ativar os receptores de LDL no fígado, aumentando a captação de LDL, levando-o ao fígado onde ele será metabolizado. Também é importante lembrar que a lipoproteína LDL libera colesterol e ésteres de colesterol para a síntese de hormônios esteroidais, reduzindo assim suas concentrações na circulação (KIRK et al., 1998).

A complexação dos flavonóides efetuada neste trabalho pode ter atenuado a propriedade da rutina de inibir lipooxigenases celulares, que desta maneira vão influenciar no mecanismo de oxidação destas moléculas.

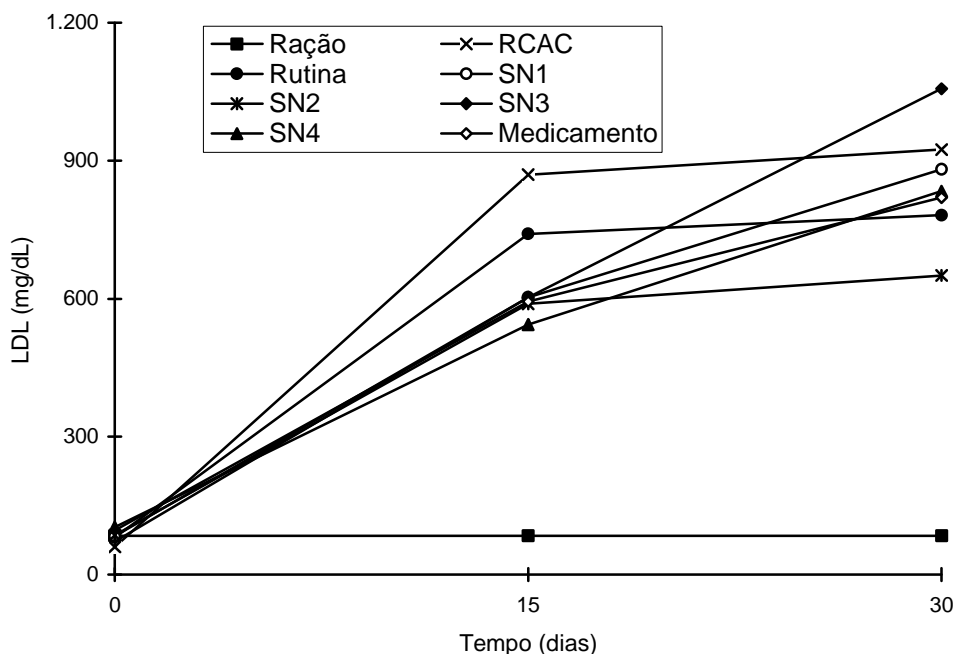


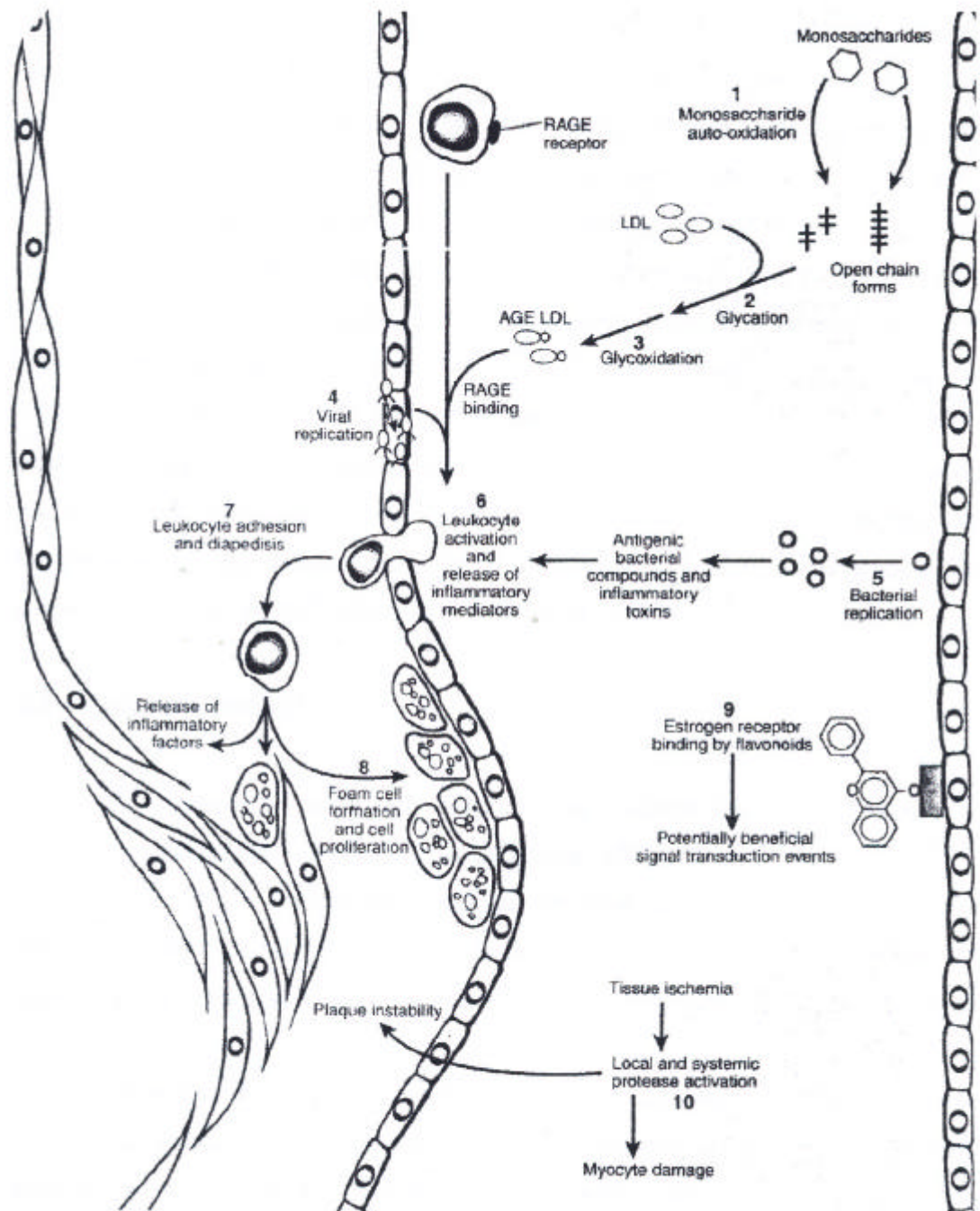
Figura 24 – LDL médio, em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substâncias-testes em cápsulas, em função do tempo.

A figura 24 mostra que o grupo controle Ração+colesterol+ácido cólico bem como os grupos que receberam os compostos Rutina, SN1, SN2, SN3, SN4 e a atorvastatina cálcica apresentaram valores de LDL-colesterol estatisticamente significativos quanto ao tempo. Todos os grupos que receberam tratamentos diferenciados apresentaram valores da concentração de colesterol-LDL menores do que o grupo que recebeu ração+colesterol+ácido cólico. Os grupos que receberam rutina e o composto SN2 apresentaram uma elevação mais significativa desta lipoproteína aos 15 dias e um pequeno aumento aos 30 dias. Os grupos que receberam os compostos SN1, SN3, SN4 e a atorvastatina cálcica apresentaram um aumento crescente desta lipoproteína apresentando concentrações maiores aos 30 dias. O grupo que recebeu o composto SN2 apresentou uma redução 32,22% aos 15 dias e 29,67% aos 30 dias desta lipoproteína. Este foi um resultado satisfatório uma vez que esta lipoproteína colesterol-LDL transporta o colesterol do fígado para os tecidos periféricos.

A figura 25 esquematiza diversos mecanismos da ação de flavonóides, principalmente aqueles que estão envolvidos nos processos de formação de placa aterosclerótica. Nestes eventos, Os monossacarídeos ao sofrerem auto-oxidação, apresentam-se com a estrutura de cadeia aberta, ligados ao colágeno. Os açúcares (tais como glicose, manose , galactose, xilose, frutose, etc...) são os que se ligam frequentemente ao colágeno. Ocorre uma glicação, que é uma condensação não enzimática na qual um açúcar reage com uma amina produzindo um glicato. Quando a reação ocorre entre um carboidrato da classe das aldoses e uma amina estes produtos são chamados de compostos de Amadori. Entretanto quando a reação acontece entre um carboidrato da classe das cetoses e uma amina estes produtos são chamados de produtos de Heys. Os flavonóides podem atuar nesta etapa impedindo a glicação que pode ocasionar a oxidação do LDL (SHRAMM et al., 1996).

Logo após a reação da glicação, os glicatos reagem com o LDL e ocorre uma glico-oxidação. Nestas reações formam-se radicais livres e também o LDL pode ser oxidado. Os produtos finais da glicação (AGE) se ligam a receptores (RAGE) nas células endoteliais e fagócitos monucleares. Neste processo, os flavonóides podem atuar impedindo a oxidação do LDL.

Nesta etapa também pode estar associada, uma replicação viral e/ou uma replicação bacteriana que com seus componentes antigênicos e toxinas inflamatórias são responsáveis pela ativação dos leucócitos, ocorre à adesão e diapedese. Em seguida, ocorre a liberação de fatores inflamatórios que vão para as células musculares e há um estímulo de formação de células em espuma e proliferação celular. Quando todos os processos associados ocorrem, forma-se a placa aterosclerótica com depósito de colesterol, levando à oclusão de artéria resultando em isquemia e ativação de várias proteases. Esta ativação das proteases local e sistêmica induz a iniciação de formação de placas e degeneração dos miocitos. Os flavonóides além de inibirem a glicação, oxidação do colesterol-LDL, atuam como agentes antibacterianos, antiviróticos e antiinflamatórios, bem como ainda podem se ligar a receptores de estrogênios, provocando efeitos benéficos na transdução de sinais.



Fonte: SCHRAMM e GERMAN, 1998

Figura 25-Illustração dos eventos pelos quais os flavonóides podem bloquear ou minimizar o aparecimento de doenças cardiovasculares

4.3- Segundo ensaio biológico com duração de 30 dias - Avaliação dos efeitos toxicológicos dos complexos do flavonóide rutina com os organoestânicos [SnClPh₃] e [SnCl₄]

O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, no esquema em parcela subdivididas, onde cada uma das parcelas foi constituída por dois sexos e três dietas: G1= ração, G2= ração + SN2 e G3= ração + SN4 e as subparcelas, por três tempos de avaliação (0, 15 e 30 dias).

Os dados de colesterol total, triacilgliceróis, HDL, glicose, proteína, albumina, ácido úrico, uréia, bilirrubina total, gama-GT, TGP, TGO, cálcio e fósforo foram submetidos à análise de variância. Os efeitos do sexo e de tempo foram estudados por meio do teste F ($P < 0,05$) e as dietas, comparadas por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quadro 5 – Valores médios de Colesterol total, em mg/dL, de coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | Machos | | Fêmeas | |
|--------------|--------------------------|-----------|---------------|-----------|---------------|
| | | Média | % de variação | Média | % de variação |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 166,03 Aa | | 141,23 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 206,60 Aa | +24,44 | 232,33 Aa | +64,50 |
| | G ₃ R + SN4 | 190,36 Aa | +14,65 | 176,10 Aa | +24,69 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 94,60 Ab | | 103,56 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 313,30 Aa | +231,18 | 138,65 Ba | +33,88 |
| | G ₃ R + SN4 | 313,30 Aa | +231,18 | 101,66 Ba | -1,83 |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 80,65 Ab | | 122,14 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 264,13 Aa | +227,50 | 158,76 Ba | +29,98 |
| | G ₃ R + SN4 | 83,46 Ab | +3,48 | 135,85 Aa | +11,22 |

Em cada dieta, A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada sexo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O quadro 5 revela a análise estatística dos valores médios da concentração de colesterol-total encontrados nas dosagens realizadas durante todo o período do experimento.

Os resultados dos experimentos realizados com coelhos controles machos bem como os coelhos controles fêmeas não apresentaram valores de colesterol total estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quanto ao sexo bem com as dietas. Resultado esperado em cada grupo uma vez que todos os animais receberam somente ração no tempo zero. A concentração de colesterol-total apresentou-se próxima da normalidade.

Aos 15 dias, entre os coelhos machos onde foram administrados os compostos SN2 e SN4, diferenciaram-se do grupo controle ração. Os

resultados mostram que um aumento estatisticamente significativo de 231,18% foi observado quando comparamos os grupos 2 e grupo 3 ao grupo 1 controle. Os índices de colesterol do grupo controle ração no tempo de 15 dias em comparação ao mesmo grupo no tempo zero apresentaram-se reduzidos, sugerindo a influência de fatores exógenos na variação deste parâmetro.

Entre as fêmeas a dosagem sanguínea aos 15 dias revelou a não diferenciação entre as dietas e não significância estatística, diferindo-se do comportamento exercido pelo grupo dos machos.

A dose de 100 mg não exerceu efeitos redutores tão satisfatórios nos níveis de colesterol apresentando valores próximos da normalidade para o grupo das fêmeas e indicando um aumento significativo para os machos.

No tempo de 30 dias o composto SN2 continuou apresentando resultados estatisticamente significativos entre as dietas revelando um aumento significativo de 264,13% em relação ao grupo 1 controle que recebeu apenas ração. Entretanto o grupo no qual o composto SN4 foi administrado revelou um comportamento diferenciado, apresentando valores próximos ao grupo 1 controle que recebeu apenas a ração, valores estes considerados próximos da normalidade.

Entre as fêmeas entre todos os grupos e em todos os tempos (0, 15, 30 dias) não apresentaram resultados estatisticamente significativos. Apresentando níveis próximos da normalidade quando comparados com os valores revelados no grupo controle ração.

A dose de 100 mg dos compostos SN2 e SN4 não apresentou eficiência na redução na concentração do colesterol-total nem aos 15 dias nem aos 30 dias. Sendo os resultados para o grupo dos machos bem diferentes uma vez que se observou um aumento aos 15 dias para SN2 e SN4 e aos 30 dias somente para o composto SN2. Já o grupo das fêmeas a tendência a valores próximos da normalidade ocorre durante todo o tratamento para os dois compostos SN2 e SN4.

É importante ressaltar que a dose testada dos compostos SN2 e SN4 no primeiro ensaio onde a hiperlipidemia foi induzida em coelhos machos foi de 5mg/dia/animal. Neste ensaio biológico essa dose foi elevada para 100mg/dia/animal, observando-se que esta concentração foi considerada tóxica para o metabolismo lipídico.

Os estudos envolvendo doses diferentes das substâncias-testes devem ser realizados com a finalidade de avaliar as diferenças gradativas dos efeitos

toxicológicos. A dose mais elevada pode produzir efeitos tóxicos, sem, no entanto, levar a mortalidade. A substância será tanto mais tóxica quanto maior for a distância entre o valor obtido e o valor normal (BRITO, 1994).

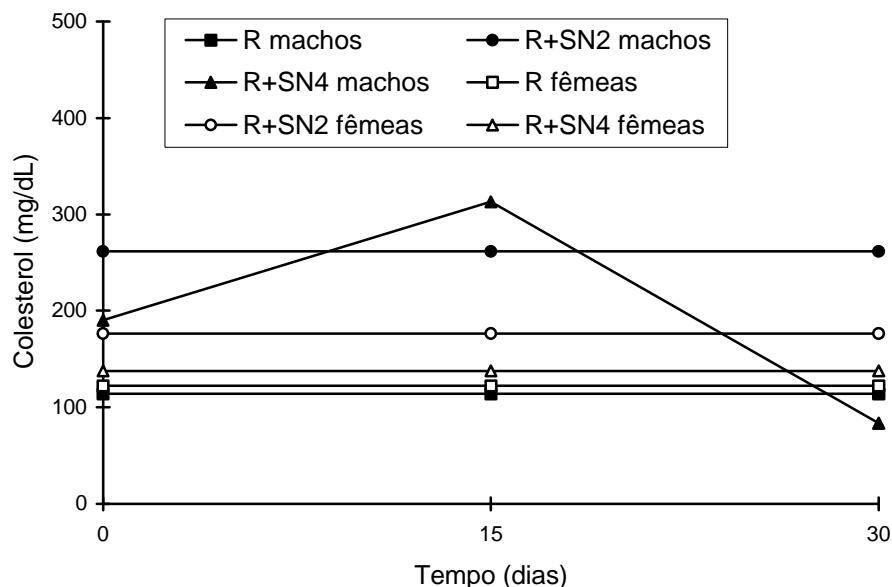


Figura 26 – Valores médios de colesterol total, em mg/dL, de coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas em função do tempo.

A figura 26 mostra que o grupo de coelhos machos que recebeu o composto SN4 apresentou resultados estatisticamente significativos em função do tempo. A concentração de colesterol apresentada pelos grupos de coelhos machos onde o composto SN4 foi administrado apresentou uma significativa elevação aos 15 dias e uma diminuição deste constituinte aos 30 dias. Os demais grupos não apresentaram resultados estatisticamente significativos em função do tempo.

Quadro 6 – Valores médios de triacilgliceróis, em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substancia teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | Machos | | Fêmeas | |
|--------------|--------------------------|-------------|---------------|-----------|---------------|
| | | Média | % de variação | Média | % de variação |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 229,43 Aa | | 267,01 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 410,73 Aa | +79,02 | 316,27 Aa | +18,45 |
| | G ₃ R + SN4 | 276,10 Aa | +20,34 | 293,10 Aa | +9,77 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 132,93 Ab | | 253,10 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 1.072,70 Aa | +706,97 | 441,86 Ba | +74,58 |
| | G ₃ R + SN4 | 158,76 Ab | +19,43 | 167,00 Aa | -34,02 |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 104,46 Aa | | 136,76 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 366,50 Aa | +250,85 | 302,30 Aa | +121,04 |
| | G ₃ R + SN4 | 116,85 Aa | +11,86 | 131,72 Aa | -3,69 |

Em cada dieta, A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada sexo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O quadro 6 revela a análise estatística dos valores médios de concentração de triglicerídios encontrados nas dosagens realizadas durante todo o período do experimento.

A dosagem efetuada no tempo 0 dias não apresentou diferenciação entre animais machos e fêmeas, bem como em cada sexo entre as dietas. Resultado satisfatório uma vez que todos os animais em cada sexo receberam somente ração em sua dieta.

Aos 15 dias, os resultados das dosagens sangüíneas em coelhos machos e fêmeas apresentaram-se estatisticamente significativos. No grupo das fêmeas nenhum dos resultados, independente dos diferentes tratamentos, apresentaram-se estatisticamente significativos, porem foi observado uma taxa de variação de

74,58% revelando um aumento deste parâmetro quando a comparação entre o grupo 2 que recebeu o composto SN2 e o grupo controle é estabelecida. Entre os machos, o grupo 2, que recebeu o composto SN2, apresentou um aumento estatisticamente significativo deste parâmetro de 706,97% em relação ao grupo 1 controle. O grupo 3 de coelhos machos que recebeu o composto SN4 apresentou valores bem próximos ao grupo controle, logo bem próximo à normalidade.

A dosagem aos 30 dias não apresentou diferença estatística entre coelhos machos e coelhos fêmeas. Em cada sexo e entre todas as dietas administradas não foram observados resultados estatisticamente significativos, apesar de se observar um aumento na porcentagem de variação de 250,85% na concentração de triacilgliceróis quando a comparação do grupo 2 dos coelhos machos com o grupo controle é efetuada. Entre as fêmeas é observada uma taxa de variação de 121,04 % apresentando assim um aumento deste parâmetro quando comparado ao grupo 1 controle das fêmeas com o grupo 2 de fêmeas que recebeu o composto SN2.

Estes resultados sugerem que a utilização da dose de 100 mg/dia/animal promoveu no que diz respeito à concentração de triacilgliceróis um efeito toxicológico para o metabolismo lipídico.

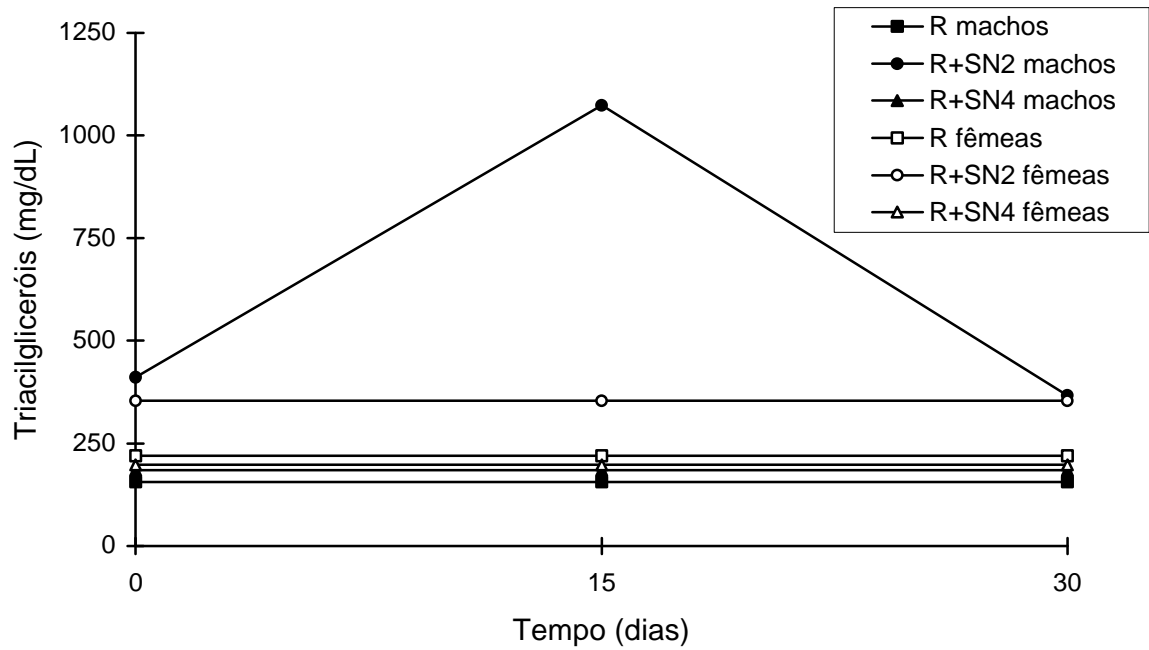


Figura 27 – Valores médios de triacilglicerol, em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas , em função do tempo.

A figura 27 mostra que o grupo de coelhos machos que recebeu o composto SN2 apresentou resultados estatisticamente significativos em relação ao tempo. A concentração de triacilglicerol apresentada pelo grupo de coelhos machos onde o composto SN2 foi administrado apresentou uma significativa elevação aos 15 dias e um diminuição deste constituinte aos 30 dias. Os demais grupos não apresentaram resultados estatisticamente significativos em função do tempo.

Quadro 7 – Valores médios de colesterol-HDL, em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substancia teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | Machos | | Fêmeas | |
|--------------|--------------------------|-----------|---------------|-----------|---------------|
| | | Média | % de variação | Média | % de variação |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 52,60 Aa | | 64,73 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 58,25 Aa | +10,74 | 59,03 Aa | -8,81 |
| | G ₃ R + SN4 | 82,22 Aa | +56,31 | 124,86 Aa | +92,89 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 70,88 Aa | | 35,43 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 158,15 Aa | +123,12 | 75,03 Aa | +111,77 |
| | G ₃ R + SN4 | 52,60 Aa | -25,79 | 37,51 Aa | +5,87 |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 22,06 Ab | | 28,66 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 201,54 Aa | +813,60 | 24,73 Ba | -13,71 |
| | G ₃ R + SN4 | 28,06 Ab | +27,20 | 32,35 Aa | +12,88 |

Em cada dieta, A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada sexo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O quadro 7 revela o resultado da análise estatística dos valores médios de concentração de colesterol-HDL encontrados nas dosagens realizadas durante todo o período do experimento.

As dosagens realizadas no tempo zero revelaram que tanto os coelhos machos quanto os coelhos fêmeas não apresentaram resultados de colesterol-HDL estatisticamente significativos. Este resultado foi satisfatório uma vez que todos os animais em cada sexo receberam somente ração antes da dosagem ser efetuada.

Aos 15 dias de experimento, não foi encontrada diferenças significativas nas concentrações de colesterol-HDL entre os sexos assim como entre os grupos em cada sexo. Estes resultados revelam níveis normais deste constituinte na condição estudada. Já aos 30 dias o grupo de coelhos machos que recebeu o composto SN4 apresentou um aumento de 813,60% na concentração de colesterol-HDL. Este

resultado relaciona-se com aquele observado no constituinte colesterol-total, também aumentado nos coelhos que receberam esta dieta. No grupo das fêmeas, neste período, os resultados obtidos com cada um dos tratamentos não foram estatisticamente significativos, revelando assim que esta dosagem de 100 mg dos compostos SN2 e SN4 para as fêmeas não alteraram os níveis desta lipoproteína quando comparados ao grupo 1 controle.

Não há a ocorrência de citações na literatura sobre até que concentração é aceitável a elevação da concentração do colesterol-HDL uma vez que esta lipoproteína apresenta um importante papel protetor em doenças cardiovasculares.

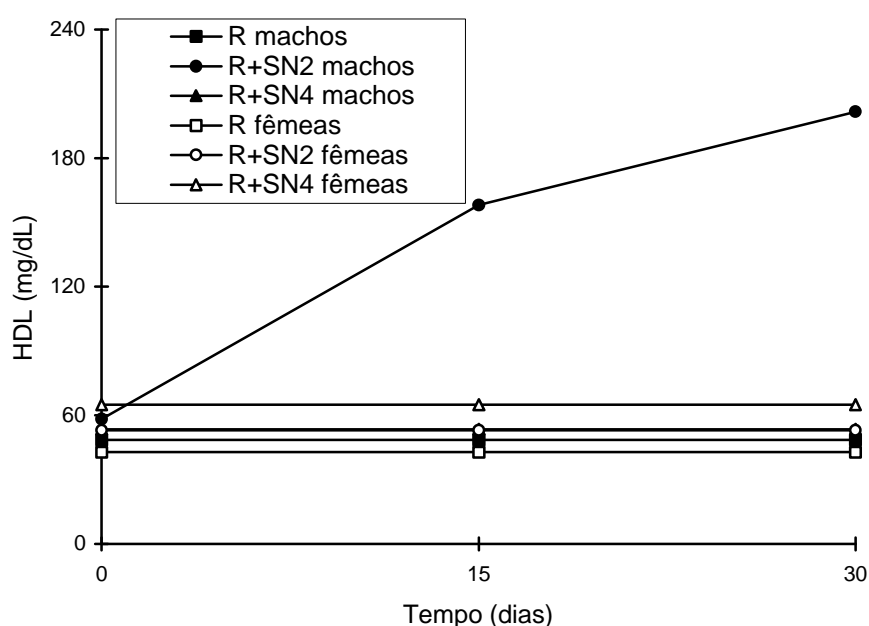


Figura 28 – Valores médios de colesterol-HDL, em mg/dL, de coelhos tratados com ração + substância-teste em cápsulas em função do tempo.

A figura 28 mostra que o grupo de coelhos machos que recebeu o composto SN2 apresentou resultados estatisticamente significativos em função do tempo. A concentração de colesterol-HDL apresentada pelos grupos de coelhos machos quando o composto SN2 foi administrado apresentou uma progressiva elevação deste constituinte aos 15 dias e 30 dias. Os demais grupos não apresentaram resultados estatisticamente significativos em função do tempo.

Quadro 8 – Valores médios de Glicose, em mg/dL, de coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | Machos | | Fêmeas | |
|--------------|--------------------------|------------|---------------|-----------|---------------|
| | | Média | % de variação | Média | % de variação |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 166,73 Aa | | 178,26 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 166,73 Aa | 0 | 178,26 Aa | 0 |
| | G ₃ R + SN4 | 133,23 Aa | -20,09 | 136,26 Ab | -23,56 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 133,23 Aa | | 136,26 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 155,31 Aa | +16,57 | 157,93 Aa | +15,90 |
| | G ₃ R + SN4 | 138,33 Aa | +3,83 | 142,60 Aa | +4,65 |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 166,73 Ab | | 178,26 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 210,95 Aa | +26,52 | 186,66 Aa | +4,71 |
| | G ₃ R + SN4 | 175,20 Aab | +5,08 | 185,05 Aa | +3,81 |

Em cada dieta, A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada sexo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O quadro 8 revela a análise estatística dos valores médios de concentração de glicose encontrados nas dosagens realizadas durante todo o período do experimento.

Durante todo experimento a concentração de glicose sangüínea de coelhos machos e fêmeas não apresentou resultados estatisticamente diferentes.

A primeira dosagem no tempo 0 dias revelou que os coelhos machos não apresentaram resultados estatisticamente significativos, porém no grupo de fêmeas, o grupo 3 que estava destinado a receber o composto SN4 apresentou-se diferente estatisticamente dos demais grupos de fêmeas revelando uma concentração de glicose menor 23,56% em comparação ao grupo controle e o grupo que posteriormente recebeu ração e SN2.

Na dosagem efetuada aos 15 dias, coelhos machos e fêmeas não apresentaram concentrações de glicose sangüínea diferentes estatisticamente bem como em cada sexo nenhum dos tratamentos apresentou resultados estatisticamente significativos.

Já aos 30 dias nos grupos dos machos observou-se uma diferença entre os tratamentos administrados sendo que o grupo que recebeu ração + SN2 apresentou um aumento de 26,52% e o grupo que recebeu ração + SN4 um aumento de 5,08% quando comparados ao grupo 1 controle.

Podemos observar a partir deste resultado que à administração do composto SN4 em coelhos fêmeas, que no início do experimento apresentavam-se com níveis de glicose menores do que o grupo controle, promoveu um pequeno aumento deste parâmetro equiparando a concentração de glicose no decorrer de todo restante do experimento, a níveis próximos da normalidade.

A glicose é o único carboidrato circulante no sangue. Os demais carboidratos podem ser encontrados temporariamente no sangue logo após a ingestão de alimentos, porém de maneira rápida estes são levados ao fígado e convertidos a glicose. A determinação de glicose sérica pode avaliar, de modo geral o metabolismo de carboidratos em um indivíduo. Fatores como distúrbios hereditários (KOZMA et al., 1974) idade, hipertermia, medicamentos e dieta (PÉGORIER et al., 1987) podem influenciar a concentração de glicose em coelhos normais.

Os níveis de glicemia são regulados pela interação de diversos hormônios, sobressaindo, devido a sua maior atividade a insulina produzida pelas células beta das ilhotas de Langerhans, cuja ação reduz a taxa glicêmica. Por outro lado a epinefrina, a norepinefrina, o glucagon (produzido pelas células alfa das ilhotas do pâncreas e células recentemente observadas no intestino), os glicocorticóides, o ACTH e o hormônio do crescimento atuam antagonicamente elevando a glicemia. A atividade harmoniosa de todos estes fatores mantém as taxas fisiológicas de glicose no sangue (LIMA, 1985).

Concentrações elevadas de glicose sérica caracteriza uma condição patológica denominada diabetes mellitus (ROTH e CONAWA, 1982).

É importante lembrar que a ração utilizada na dieta dos coelhos contém em torno de 80% de carboidratos. Evidências mostram que coelhos podem manter a concentração de glicose durante pequenos períodos de jejum sendo variações

observadas (FOX and LAIRD, 1970). Experimentos mostram que coelhos adultos uma hora antes de se alimentarem apresentam a concentração de glicose em torno de 115 mg/dL e 3 horas após se alimentarem essa concentração passa para 130 mg/dL em coelhos fêmeas e 145 mg/dL em coelhos machos (FOX e LAIRD, 1970). Este parâmetro é influenciado pela ração administrada. Os valores de glicemia revelados por coelhos presentes no grupo controle do experimento descrito neste trabalho apresentam a concentração de glicose acima da citada pela literatura.

A hipertermia em coelhos, quando a temperatura corporal fica em torno de 43,5 °C, resulta num elevado aumento da concentração de glicose sanguínea de 104 mg/dL para 349 mg/dL. Estes resultados sugerem que a hipertermia inibe a o metabolismo de carboidratos e promove a proteólise como um processo alternativo de produção de energia (MARDER et al, 1990).

Em choques hemorrágicos experimentais a concentração de glicose é aumentada na proporção da quantidade de sangue perdido e a pressão arterial sofre um decréscimo significativo. Em choques traumáticos, ocorre um ligeiro decréscimo da pressão arterial e um marcante aumento da concentração de glicose sangüínea. Estes achados sugerem que a concentração de glicose sangüínea pode fornecer uma prematura indicação do tipo e do grau do rigor do choque (HOLZRICHTER et al., 1987).

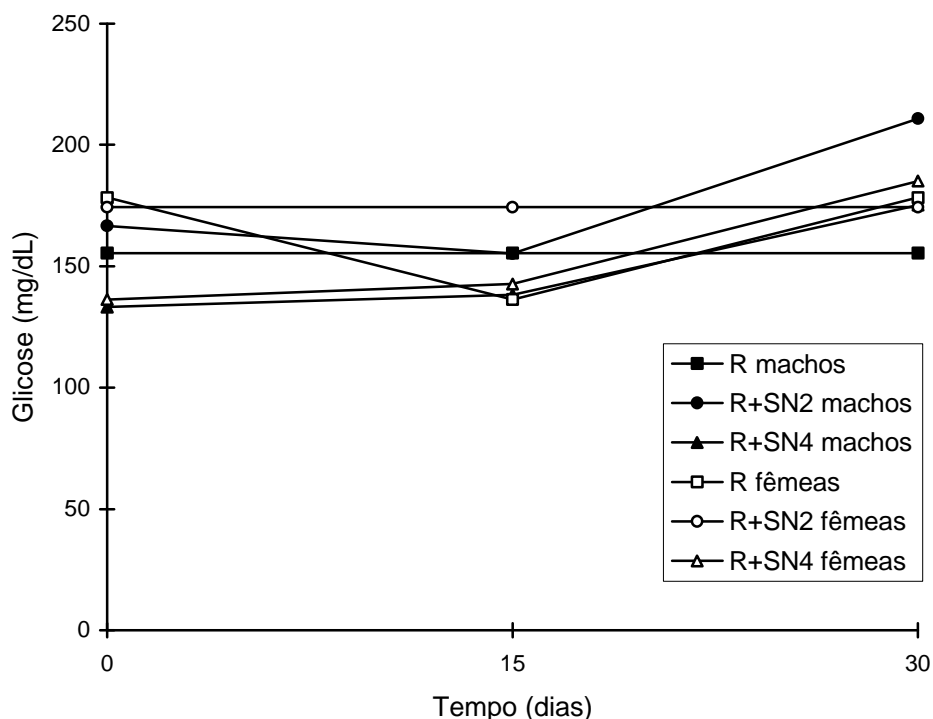


Figura 29 – Valores médios de glicose, em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas, em função do tempo.

A figura 29 mostra que o grupo de coelhos fêmeas controle e o grupo que recebeu o composto SN4, bem como os grupos de coelhos machos os quais os compostos SN2 e SN4 foram administrados, apresentaram resultados estatisticamente significativos em função do tempo. A concentração de Glicose apresentada pelo grupo de coelhos fêmeas controle apresentou um decréscimo aos 15 dias e aos 30 dias um apreciável aumento. Entre os grupos de coelhos (machos e fêmeas) para os quais o composto SN4 foi utilizado e coelhos machos, para os quais o composto SN2 foi utilizado, um perfil bem similar à dosagem no tempo 0 dias foi estabelecida aos 15 dias, entretanto aos 30 dias a concentração deste constituinte apresentou uma aumento. Os demais grupos não apresentaram resultados de concentração de glicose sanguínea estatisticamente significativos em função do tempo.

Quadro 9 – Valores médios de proteína total, em g/dL, de coelhos tratados com ração + substância teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | Machos | | Fêmeas | |
|--------------|--------------------------|-----------|---------------|-----------|---------------|
| | | Média | % de variação | Média | % de variação |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 71,27 Ab | | 69,94 Ab | |
| | G ₂ R + SN2 | 78,97 Bab | +10,80 | 107,40 Aa | +53,56 |
| | G ₃ R + SN4 | 85,03 Aa | +19,31 | 82,49 Ab | +17,94 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 58,26 Aa | | 57,83 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 57,65 Aa | -1,05 | 63,16 Aa | +9,22 |
| | G ₃ R + SN4 | 63,03 Aa | +8,19 | 54,76 Aa | -5,31 |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 62,43 Aa | | 65,63 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 70,50 Aa | +12,93 | 72,83 Aa | +10,97 |
| | G ₃ R + SN4 | 62,96 Aa | +0,85 | 67,87 Aa | +3,41 |

Em cada dieta, A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada sexo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O quadro 9 revela a análise estatística dos valores médios da concentração de proteína total encontrados nas dosagens realizadas durante todo o período do experimento.

No tempo zero foi observado diferenças entre os animais mesmo que nenhum tratamento diferenciado tivesse sido utilizado. O grupo 2 ao qual posteriormente foi administrado o composto SN2, logo após a primeira dosagem sanguínea, apresentou resultados estatisticamente significativos entre os sexos bem como e em cada sexo entre os diferentes tratamentos utilizados. Entre os machos este grupo apresentou níveis de proteína total 10,80% maiores do que o grupo 1 controle. O grupo 3 ao qual foi posteriormente administrado SN4 também

apresentou níveis de proteína total aumentados de 19,31% quando comparado ao grupo 1 controle.

Entre as fêmeas a concentração de proteína total sérica do grupo 2 apresentou-se 53,56% maior do que os níveis protéicos totais do grupo 1 controle.

Durante todo o restante do tratamento, as dosagens tanto aos 15 dias como aos 30 dias não apresentaram valores de concentração proteínas totais significativos estatisticamente. Os valores obtidos para machos e fêmeas também não apresentaram diferentes estatisticamente. Estes resultados sugerem que o tratamento com os compostos SN2 e SN4 em grupos distintos de coelhos machos e fêmeas não ocasionou efeitos toxicológicos deste parâmetro e de maneira bem satisfatória permaneceu constante a medida que o tratamento foi efetuado, a normalidade dos níveis de proteína totais em todos os grupos e entre os sexos.

A concentração de proteína total sérica em coelhos é similar a outras espécies. Um coelho adulto possui em torno de 60-70 g/L de proteína total sérica. O teor de proteína total pode se dividir a partir em quantidade relativas mencionada de albumina (40-60%), α_1 -globulinas (5-10%), α_2 -globulinas (5-10%), β -globulinas (5-15%) e γ -globulinas (5-10%) (IRFAN, 1967; JAKUBÓW and GROMADZKA-OSTROWKSA, 1987; BORTOLOTTI et al., 1989).

A redução da concentração de proteínas totais, de modo geral está associada a desordens renais e do fígado. O aumento da concentração de proteínas totais ocorre em desidratação ou em choques (FOX, 1989). Também é observado o aumento de proteínas totais e globulinas em hipertermia (MARDER et al, 1990).

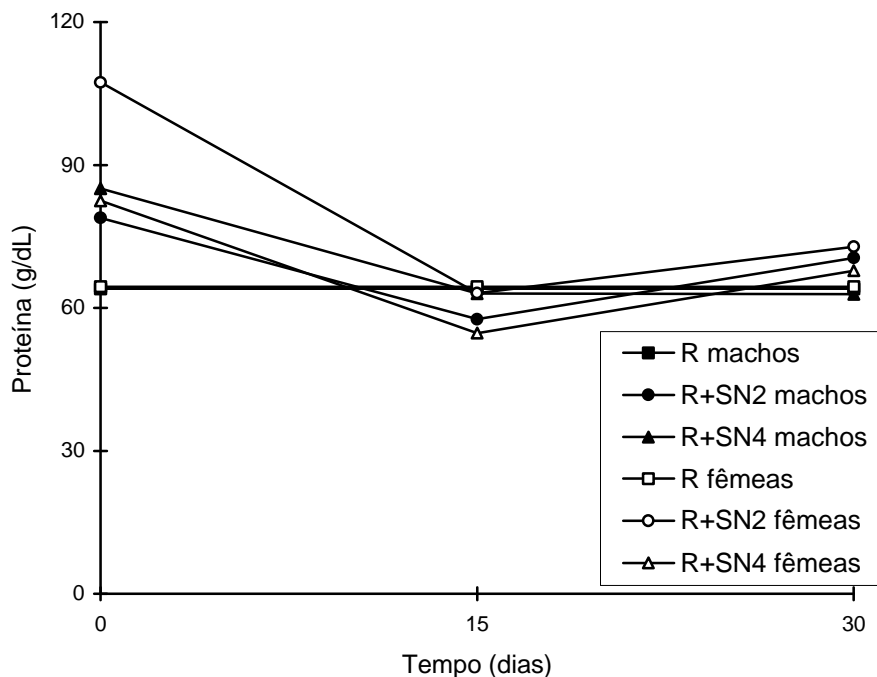


Figura 30 – Valores médios de proteína total, em g/dL, em coelhos tratados com ração + substância-teste em cápsulas , em função do tempo.

A figura 30 mostra que os grupos controles de coelhos machos e de coelhos fêmeas não apresentaram resultados de valores médios de proteína total estatisticamente significativos em função do tempo. Os grupos de coelhos machos assim como de fêmeas onde o composto SN2 foi administrado obtiveram uma redução deste constituinte aos 15 dias. Aos 30 dias as taxas apresentadas foram similares à observadas na dosagem no tempo 0. Os grupos onde o composto SN4 foi administrado apresentaram, entre os machos uma redução aos 15 dias, com um perfil constante ao 30 dias, já entre as fêmeas a redução também foi observada aos 15 dias porém aos 30 dias apresentou um pequeno aumento deste constituinte.

Quadro 10 – Valores médios de albumina, em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | Machos | | Fêmeas | |
|--------------|--------------------------|----------|---------------|----------|---------------|
| | | Média | % de variação | Média | % de variação |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 7,46 Ab | | 8,11 Ab | |
| | G ₂ R + SN2 | 10,05 Aa | +34,72 | 10,94 Aa | +34,90 |
| | G ₃ R + SN4 | 9,56 Aa | +28,15 | 8,56 Bb | +5,55 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 4,74 Ba | | 5,92 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 5,55 Aa | +17,09 | 5,43 Aa | -8,28 |
| | G ₃ R + SN4 | 5,37 Aa | +13,29 | 5,11 Aa | -13,68 |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 4,75 Aa | | 4,89 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 4,85 Aa | +2,11 | 5,17 Aa | +5,73 |
| | G ₃ R + SN4 | 5,05 Aa | +6,32 | 5,11 Aa | +4,50 |

Em cada dieta, A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada sexo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O quadro 10 revela a análise estatística dos valores de concentração de albumina sérica encontrados nas dosagens realizadas durante todo o período do experimento.

A concentração de albumina sérica apresentou resultados estatisticamente significativos na dosagem de tempo 0, antes que fosse efetuado qualquer tratamento diferenciado. Coelhos machos do grupo 2 que após a dosagem inicial receberam o composto SN2 apresentaram índices de albumina 34,72% maiores do que o grupo 1 controle. Os coelhos machos que após a dosagem inicial receberam o composto SN4 apresentaram níveis de albumina 28,15% maior em relação ao grupo 1 controle. Já entre as fêmeas somente o grupo 2 que posteriormente iria receber o tratamento com o composto SN2 apresentou resultados estatisticamente

significativos. Devido a estes resultados foi observado também uma diferença entre os coelhos fêmeas e machos do grupo 3 destinado a receber o composto SN4.

Aos 15 dias, os grupos controles machos apresentaram valores médios de concentração de albumina sérica estatisticamente significativos em relação aos grupos de fêmeas. Porém entre os coelhos do grupo 2 que receberam o composto SN2, bem como os coelhos do grupo 3 que receberam o composto SN4, não apresentaram resultados estatisticamente significativos. Aos 30 dias o resultado se repetiu entre machos e fêmeas e em cada tratamento e os resultados obtidos neste período não foram estatisticamente significativos.

Estes resultados sugerem que o uso destes compostos na concentração de 100 mg/dia em coelhos machos e fêmeas não foi tóxico para a concentração de Albumina sérica. Os níveis deste constituinte ao final do experimento apresentaram-se normais quando comparados ao grupo 1 controle.

O fígado é o principal órgão de produção da albumina. Esta proteína tem como função promover o transporte de medicamentos, nutrientes e outros constituintes químicos. A hiperalbuminemia ocorre na desidratação. A redução da concentração desta proteína é observada em diversas situações, como na síndrome nefrótica pela perda maciça do constituinte pelos rins e a diminuição da capacidade de síntese pelo organismo, na insuficiência hepática avançada (cirrose, colangite, fígado cardíaco, hepatites crônicas, neoplasias), no catabolismo exaltado que acompanha o diabetes, a tireotoxicose, os estados febris prolongados e nas hemorragias maciças. (LIMA, 1985).

Estudos de casos de esquistossomose apresentaram a redução dos níveis de albumina sérica e nítido aumento de globulina (frações alfa-2 e gama).

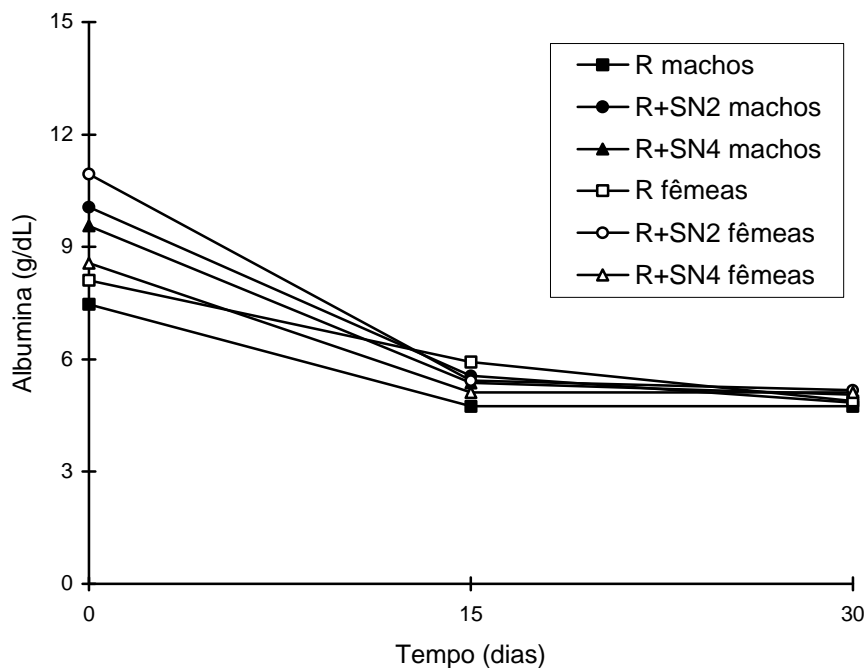


Figura 31 – Albumina média, em g/dL, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas, em função do tempo.

A figura 31 mostra que todos os grupos apresentaram resultados das dosagens de albumina sérica estaticamente significativos em função do tempo. As concentrações de albumina sofreram uma redução aos 15 dias e mantiveram suas concentrações constantes aos 30 dias.

Quadro 11 – Valores médios de ácido úrico, em g/dL, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | Machos | | Fêmeas | |
|--------------|--------------------------|----------|---------------|-----------|---------------|
| | | Média | % de variação | Média | % de variação |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 0,328 Aa | | 0,358 Ab | |
| | G ₂ R + SN2 | 0,392 Ba | +19,51 | 0,568 Aa | +58,66 |
| | G ₃ R + SN4 | 0,338 Aa | +3,05 | 0,170 Bb | -52,51 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 0,210 Aa | | 0,198 Aab | |
| | G ₂ R + SN2 | 0,270 Aa | +28,57 | 0,352 Aa | +77,78 |
| | G ₃ R + SN4 | 0,216 Aa | +2,86 | 0,050 Ab | -74,75 |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 0,052 Aa | | 0,084 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 0,158 Aa | +203,85 | 0,078 Aa | -7,14 |
| | G ₃ R + SN4 | 0,062 Ba | +19,23 | 0,228 Aa | +171,43 |

Em cada dieta, A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada sexo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O quadro 11 revela a análise estatística dos valores médios da concentração de ácido úrico sérico encontrados nas dosagens realizadas durante todo o período do experimento.

Os coelhos no tempo zero apresentaram algumas diferenças estatísticas no que diz respeito a concentração de ácido úrico sanguíneo. Machos apresentaram resultados quanto a concentração de ácido úrico estatisticamente significativos quando comparados aos apresentados pelas fêmeas no grupo 2 destinado ao tratamento com SN2 e o grupo 3 destinado ao tratamento com o composto SN4. Porém o grupo 1 controle não revelou esta diferenciação entre os sexos. Esta diferença é aceitável uma vez que os índices de ácido úrico podem ser diferentes entre machos e fêmeas. Mesmo que o tratamento com os compostos mencionados não tivesse sido iniciado observou-se no grupo de fêmeas resultados

estatisticamente significativos entre os coelhos do grupo 2 destinado ao tratamento com SN2 sendo este 58,66% maior do que grupo 1 controle.

A dosagem aos 15 dias não apresentou resultados estatisticamente significativos entre os sexos. No grupo dos machos nenhum tratamento ocasionou resultados diferentes estatisticamente, o que não é verdadeiro para os grupos de fêmeas. O grupo de fêmeas tratado com o composto SN2 apresentou resultados estatisticamente significativos quando comparado ao grupo 3 que recebeu o composto SN4. Porém os grupos 2 e 3 não apresentaram resultados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo 1 (controle).

Aos 30 dias o grupo de coelhos machos apresentou valores de concentração de ácido úrico estatisticamente significativos quando comparados ao grupo de fêmeas, apenas para os que receberam cápsulas de SN4. Os grupos G_1 e G_2 das fêmeas não foram estatisticamente diferentes.

Numa análise do comportamento da concentração de ácido úrico durante todo período experimental observou-se, porém, uma redução elevada nos níveis de ácido úrico dos coelhos do grupo controle o que nos sugere a existência de fatores independentes aos tratamentos utilizados, que estaria promovendo esta redução de modo generalizado. A relação entre os grupos tratados e os grupos controle em cada sexo poderia estar sofrendo a influência destes fatores e assim modificando a resposta do teste. É importante ressaltar que o composto SN4 na dose testada no grupo de fêmeas elevou a concentração de ácido úrico em 171,43% aos 30 dias, revelando assim tóxico nesta dose. Enquanto entre os machos o composto SN2 aumentou a concentração de ácido úrico em 203,85%, que também indica toxicidade desta substância nesta dose.

A taxa normal de ácido úrico no soro ou plasma varia de 2 a 7 mg/dL nos homens e 2 a 6,5 mg/dL, nas mulheres, antes da menopausa. Empregando se o método com uricase os valores podem se apresentar um pouco superiores. Nos homens o ácido úrico é o principal produto final do metabolismo de purinas. A elevação dos níveis plasmáticos de ácido úrico se da pelo excesso de produção ou redução da excreção renal.

Diversas síndromes podem apresentar como um de seus sintomas a hiperuricemia como na eclâmpsia, lesões renais (pielonefrites, rins policísticos), na insuficiência cardíaca congênita, na tuberculose e todas as formas de insuficiência renal. Nas manifestações hematológicas (leucemia, policitemia, drepanocitose,

talassemia, anemia hemolítica), na vigência de radioterapia em processos neoplásicos, em transtornos neurológicos e mentais, na síndrome de Down, na psoríase, no jejum prolongado observa-se também a elevação do ácido úrico (LIMA, 1985)

A gota, doença caracterizada por um distúrbio do metabolismo das bases purínicas e ocorre predominantemente no sexo masculino, onde as concentrações de ácido úrico apresentam-se acima de 10 mg/dL devido a produção excessiva do ácido úrico e simultaneamente à redução da excreção através dos rins. A hiperuricemia é pouco freqüente e de significado clínico limitado ocorrendo, por exemplo, na xantinúria hereditária e distúrbios tubulares (doença de Wilson e síndrome de Fanconi).

Na degradação das bases purinas inicialmente ocorre uma reação de hidrólise catalisada por nucleotidasas convertendo então nucleotídios a nucleosídeos. Em segunda etapa inicia-se a clivagem fosforolítica que vão promover a conversão destes nucleosídeos a bases livres e ribose 1 fosfato (ou desoxirribose 1 fosfato). Esta etapa é catalisada por enzimas denominadas nucleosídeo fosforilases. Algumas das bases são reutilizadas, formando nucleotídeos por vias de recuperação. A via de degradação, como o exemplo do AMP inclui mais etapas ao processo (Stryer, 1996).

O catabolismo purínico se torna distinto nos animais a partir da xantina. Em coelhos termina na alantoína diferindo-se, por exemplo, de macacos superiores, aves e répteis terrestres onde este processo termina no ácido úrico (LIMA, L. R. P., 2001).

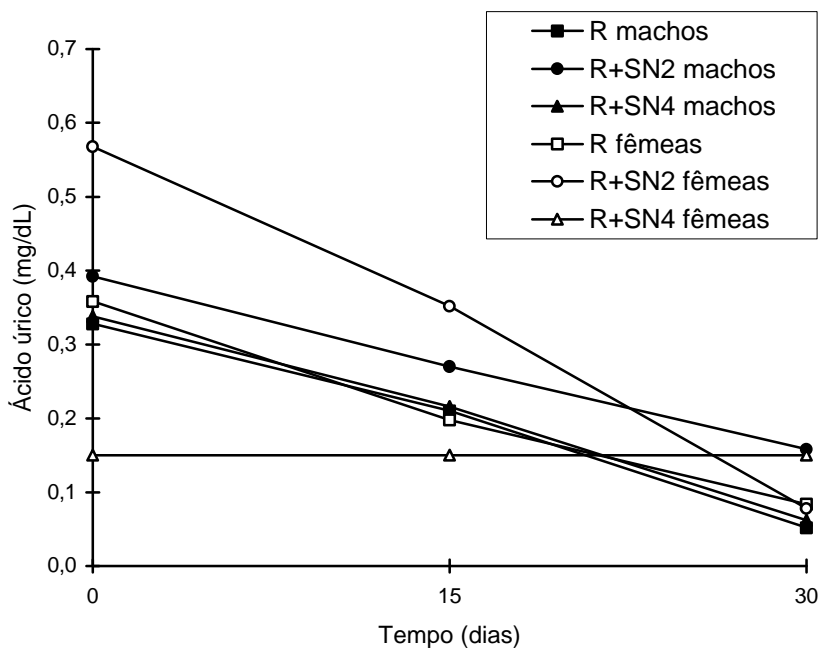


Figura 32– Valores médios de ácido úrico, em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas , em função do tempo.

A figura 32 mostra que apenas o grupo de coelhos fêmeas que recebeu o composto SN4 apresentou os resultados de valores médios de ácido úrico estatisticamente não significativos em relação ao tempo. Os demais grupos apresentaram uma redução progressiva deste parâmetro aos 15 e 30 dias, no entanto o grupo de coelhos fêmeas para os quais o composto SN2 foi administrado apresentou a maior variação deste constituinte.

Quadro 12 – Valores médios de uréia, em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | Machos | | Fêmeas | |
|--------------|--------------------------|----------|---------------|-----------|---------------|
| | | Média | % de variação | Média | % de variação |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 90,00 Aa | | 93,65 Aab | |
| | G ₂ R + SN2 | 64,80 Bb | -28,00 | 82,38 Ab | -12,03 |
| | G ₃ R + SN4 | 98,65 Aa | +9,61 | 111,20 Aa | +18,74 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 47,96 Aa | | 52,10 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 45,30 Aa | -5,55 | 45,50 Aa | -12,67 |
| | G ₃ R + SN4 | 42,66 Aa | -11,05 | 36,80 Aa | -29,37 |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 19,53 Aa | | 30,06 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 17,83 Aa | -8,70 | 23,88 Aa | -20,56 |
| | G ₃ R + SN4 | 17,83 Aa | -8,70 | 21,30 Aa | -29,14 |

Em cada dieta, A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada sexo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O quadro 12 revela a análise estatística dos valores de concentração de uréia sérica encontrados nas dosagens realizadas durante todo o período do experimento.

Coelhos machos e fêmeas apresentaram valores da concentração de uréia estatisticamente significativos somente na dosagem de tempo inicial (tempo 0 dias) entre os coelhos destinados ao tratamento com o composto SN2 + ração. Durante todo período restante do experimento (dosagem aos 15 dias e dosagem aos 30 dias) os coelhos machos não apresentaram resultados estatisticamente diferentes dos apresentados pelas fêmeas.

No tempo 0 dias foi observado, para cada sexo, resultados estatisticamente significativos, revelando uma não homogeneidade destes animais no que diz

respeito a este parâmetro. Entre os coelhos machos do grupo 2 destinados a serem tratados com o composto SN2 apresentaram valores da concentração de uréia sérica estatisticamente significativos quando comparados aos coelhos machos do grupo 1. Os coelhos destinados a serem tratados com SN4, apresentaram a concentração de uréia 28,00% menor que o controle. Já entre as fêmeas os grupos 2 e grupo 3 apresentaram resultados estatisticamente significativos porem não foram estatisticamente significativos quando comparados ao grupo 1 controle. As dosagens em 15 dias como em 30 dias não apresentaram resultados estatisticamente significativos entre os sexos, bem como em cada sexo entre os tratamentos utilizados. Estes resultados sugerem que o tratamento com estes compostos SN2 e SN4 na concentração de 100mg/dia não ocasionou efeitos tóxicos para este constituinte. À medida que o tratamento foi sendo efetuado observou-se a partir das duas dosagens aos 15 dias e aos 30 dias se estabeleceu uma tendência a normalidade deste parâmetro em cada grupo bem como em cada sexo.

Observou-se ainda que os animais tratados com SN2 tiveram uma redução na concentração de ácido úrico de 12,67% aos 15 dias e 20,56% aos 30 dias. Os animais tratados com o SN4 tiveram uma redução de 29,37% aos 15 dias e 29,14% aos 30 dias. Isto sugere que mesmo numa dose elevada, estes compostos não afetam o metabolismo de proteínas e aminoácidos e provavelmente podem não ter afetado o tecido hepático dos coelhos.

No homem e nos mamíferos de modo geral, a uréia é o principal produto do metabolismo protéico. Coelhos de uma maneira singular eliminam amônia como principal forma de excreção nitrogenada. A taxa de uréia no sangue, em indivíduos normais, varia de 20 a 40 mg/dL, sendo também aceitas taxas de 50 mg/dL sem nenhuma patologia constatada. Em coelhos essa variação se faz 12 a 34 mg/dL.

A uréia é formada no fígado a partir de aminoácidos e do íon amônio (NH_4), este derivado, em grande parte, da ação bacteriana no intestino grosso. O grupo NH_2 dos aminoácidos que não é utilizado pelo organismo, é transformado em uréia. A uréia representa cerca de 50% do azoto não protéico (LIMA, 1985).

O fígado é o órgão de formação da uréia, mas a redução da azotemia somente ocorre nas lesões hepáticas muito extensas. A dosagem da uréia fornece grande subsídio semiológico, quando relacionada como sua excreção urinária.

A elevação deste constituinte no plasma ocorre em choques traumáticos, choque hemorrágico, desidratação aguda ou perda de eletrólitos (acidose diabética, doença de Addison, desintéria aguda), descompensação cardíaca, infecção aguda e toxemia, glomerulite, nefrosclerose, hemoglobinúria, tumores compressivos de bexiga bem como em síndromes que possam causar a redução da eliminação renal em combinação com o aumento do catabolismo protéico. A taxa de uréia se encontra reduzida, na insuficiência hepática aguda (atrofia amarela do fígado, necrose hepática tóxica devido a solventes como o tetracloreto de carbono e clorofórmio) e na inanição (LIMA, 1985).

Pelo ciclo da uréia um dos átomos de nitrogênio da uréia sintetizada por essa via é proveniente de um aminoácido: o aspartato. O outro átomo de nitrogênio e o átomo de carbono são derivados de NH_4^+ e CO_2 . A ornitina é o carregador desses átomos de carbono e nitrogênio. O percussor imediato da uréia é a arginina, que é hidrolisada à uréia e ornitina pela arginase. As outras reações do ciclo de uréia levam à síntese de arginina a partir da ornitina. Primeiro, um grupo carbamila é transferido à ornitina para formar citrulina, em uma reação catalisada pela ornitina transcarbamilase. O doador de carbamila nessa reação é o carbamil fosfato, que tem alto potencial de transferência de grupamentos devido sua ligação anidrido. A argininossuccinato sintetase catalisa, então, a condensação de citrulina e aspartato. Essa síntese de argininossuccinato é impelida pela clivagem de ATP em AMP e pirofosfato e pela subsequente hidrólise de pirofosfato. Finalmente, e arginossuccinase cliva o argininossuccinato em arginina e fumarato. Essas reações, que transferem a amina do aspartato para formar arginina, preservam o esqueleto carbonado do aspartato, na forma de fumarato (STRYER, 1996).

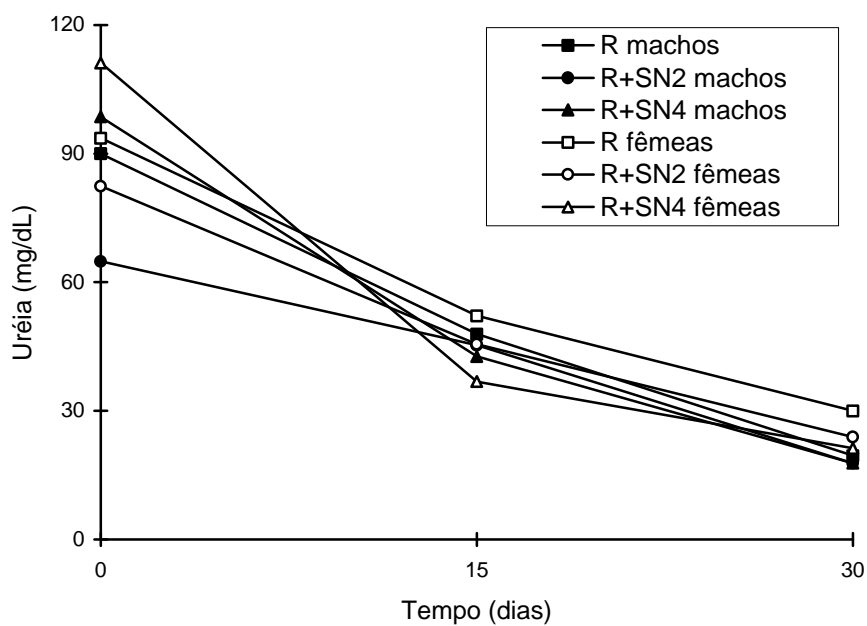


Figura 33 – Valores de uréia, em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas, em função do tempo.

A figura 33 mostra que todos os grupos apresentaram resultados estatisticamente significativos em função do tempo. A concentração de uréia sérica apresentou de modo geral uma redução progressiva aos 15 e 30 dias.

Quadro 13 – Valores médios de Bilirrubina total, em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | Machos | | Fêmeas | |
|--------------|--------------------------|----------|---------------|----------|---------------|
| | | Média | % de variação | Média | % de variação |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 0,152 Aa | | 0,158 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 0,048 Ab | -68,42 | 0,062 Ab | -60,76 |
| | G ₃ R + SN4 | 0,168 Aa | +10,53 | 0,152 Aa | -3,80 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 0,152 Aa | | 0,158 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 0,178 Aa | +17,11 | 0,170 Aa | +7,59 |
| | G ₃ R + SN4 | 0,168 Aa | +10,53 | 0,152 Aa | -3,80 |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 0,048 Aa | | 0,062 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 0,070 Aa | +45,83 | 0,058 Aa | -6,45 |
| | G ₃ R + SN4 | 0,036 Aa | -25,00 | 0,070 Aa | +12,90 |

Em cada dieta, A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada sexo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O quadro 13 revela a análise estatística dos valores de concentração de bilirrubina-total sérica encontrados nas dosagens realizadas durante todo o período do experimento.

Durante todo experimento coelhos machos e coelhos fêmeas não apresentaram valores de concentração de bilirrubina total estatisticamente significativos comparando-se os sexos.

Na dosagem no tempo zero, para cada sexo, o grupo 2 onde posteriormente o composto SN2 foi administrado apresentou resultados estatisticamente significativos quando comparado ao grupo controle. Isto sugere a não homogeneidade entre os animais. O grupo 2 que foi destinado à administração do composto SN2 logo após a primeira dosagem ter sido efetuada, apresentou entre

as fêmeas uma redução de 60,76% na concentração de bilirrubina total em relação ao grupo 1 controle enquanto que entre o grupo 2 dos machos a redução observada foi de 68,42% também em comparação ao grupo 1 controle.

Durante as dosagens de 15 e 30 dias os resultados obtidos foram estatisticamente não significativos entre os grupos, tanto entre machos como entre as fêmeas. Os resultados obtidos demonstram que as variações dos valores de bilirrubina total apresentaram-se 7,59% maiores aos 15 dias e 12,90% aos 30 dias para os animais tratados com o composto SN2 na dose de 100mg. No entanto os valores obtidos ainda estavam dentro da faixa de valores normais demonstrando que possivelmente não houve aumento no catabolismo da hemoglobina.

A concentração normal de bilirrubina total em coelhos é aceitável até a faixa de 0,1 à 0,40mg/dL. Para humanos esta faixa é 10 mg/L. A bilirrubina origina-se no sistema primário do reticuloendotelial pelo catabolismo da hemoglobina para a biliverdina, que é convertida a bilirrubina. A bilirrubina é transportada para o fígado onde esta é conjugada pela glicoroniltransferase e secretada na bile (NOTTER, 1985). A bilirrubina é um produto heme final excretado na forma de bile pela maioria dos mamíferos. Entretanto, os coelhos excretam aproximadamente 70% de biliverdina e 30% de bilirrubina, aproximadamente 90% da bilirrubina na bile é conjugada. Bilirrubina secretada pelo fígado de coelho é excretada predominantemente sob a forma de um monoconjugado enquanto na maioria dos outros mamíferos essa excreção ocorre na forma de diconjugados (BRUSS et.al., 1983; GONZALES et al., 1983; MUNÓZ et al., 1987).

Em coelhos praticamente toda a bilirrubina plasmática é conjugada (GONZALES et al., 1983). Biliverdina é aparentemente ausente do sangue de coelhos normais (MUNÓZ et al., 1987). Não são encontradas diferenças significativas da concentração de bilirrubina total quando se associa à fatores como o sexo ou raça (FOX et al., 1974). A administração de glicose para coelhos em jejum leva ao aumento de excreção de bilirrubina, e um decréscimo da concentração de bilirrubina plasmática e um correspondente decréscimo na concentração de bilirrubina não-conjugado no fígado. Isto se deve a aumento da atividade das enzimas envolvidas na conjugação de bilirrubina, e muitos autores sugerem que glicose exógena modifica o processo de conjugação hepática da bilirrubina (MUNÓZ et al., 1987).

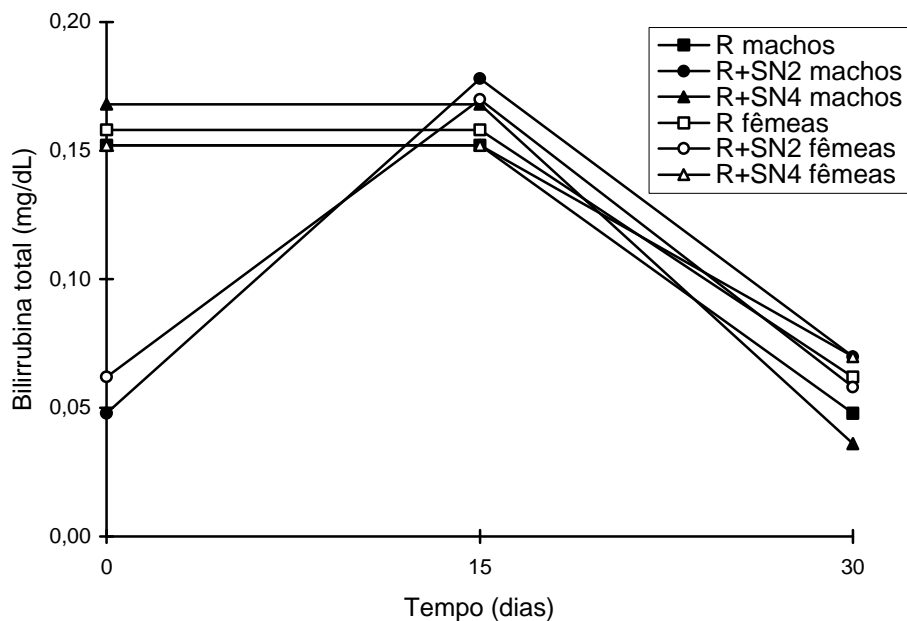


Figura 34 – Valores médios de Bilirrubina-total, em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas, em função do tempo.

A figura 34 mostra que todos os grupos apresentaram resultados de concentração de bilirrubina total estatisticamente significativos em função do tempo. Os grupos controles bem como os grupos que receberam o composto SN4 apresentam a concentração de bilirrubina total constante aos 15 dias e um significativo decréscimo aos 30 dias. Já os grupos que receberam o composto SN2 apresentaram uma elevação deste constituinte aos 15 dias acompanhado de uma acentuada redução aos 30 dias.

Quadro 14 – Valores médios de gama-GT, em UI, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | Machos | | Fêmeas | |
|--------------|--------------------------|-----------|---------------|----------|---------------|
| | | Média | % de variação | Média | % de variação |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 17,00 Aa | | 19,66 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 17,00 Aa | 0 | 19,66 Aa | 0 |
| | G ₃ R + SN4 | 17,00 Aa | 0 | 19,00 Aa | -3,36 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 17,00 Aab | | 19,66 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 7,50 Ab | -55,88 | 19,00 Aa | -3,36 |
| | G ₃ R + SN4 | 26,66 Aa | +56,82 | 14,67 Aa | -25,38 |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 14,66 Aa | | 13,66 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 13,00 Aa | -11,32 | 18,00 Aa | +31,77 |
| | G ₃ R + SN4 | 17,33 Aa | +18,21 | 25,50 Aa | +86,68 |

Em cada dieta, A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada sexo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O quadro 14 revela a análise estatística dos valores médios de concentração de gama-GT encontradas nas dosagens realizadas durante todo o período do experimento.

Durante todo o experimento coelhos machos os resultados obtidos para os grupos de coelhos machos não foram estatisticamente significativos quando comparados aos grupos de coelhos fêmeas. Bem como na dosagem inicial (tempo 0 dias) dentro de cada sexo, quando se compara os diferentes tratamentos. Demonstrando a homogeneidade entre os animais no que diz respeito a esse parâmetro. A dosagem efetuada aos 15 dias revelou resultados estatisticamente significativos quando comparamos o grupo 2 com grupo 3. Entretanto quando a comparação destes grupos com o grupo 1 é efetuada observa-se resultados

estatisticamente não significativos entre os machos. Já entre as fêmeas não foi obtido resultados estatisticamente significativos para nenhum grupo. Aos 30 dias tanto entre coelhos machos como entre coelhos fêmeas não foi obtido nenhum resultado estatisticamente significativo. Entretanto o grupo 3 das fêmeas onde o composto SN4 foi administrado apresentou um taxa de variação de 86,68% maior do que a concentração revelada pelo grupo 1 controle

A gama glutamil transferase (E.C 2322) está relacionada com a membrana plasmática e com a catálise efetuada por enzimas que atuam sobre a gama cistenil glicina, produzindo gama glutamil aminoácido e cistenil glicina que resulta na transferência de resíduo de glutamil do glutation para o aminoácido que esta penetrando no citoplasma celular. Esta reação é um exemplo de translocação de grupos no qual o substrato transportado aparece numa forma química diferente dentro da célula. Todo este processo representa uma forma de entrada dos aminoácidos para o interior da célula (LEHNINGER, 1995). Uma alteração acentuada na concentração normal desta enzima gama glutamil transferase pode afetar este transporte de aminoácidos para o interior das células. Desta forma, poderia haver alterações da síntese protéica a nível de reticulo endoplasmático rugoso e, ou, polirribossomo.

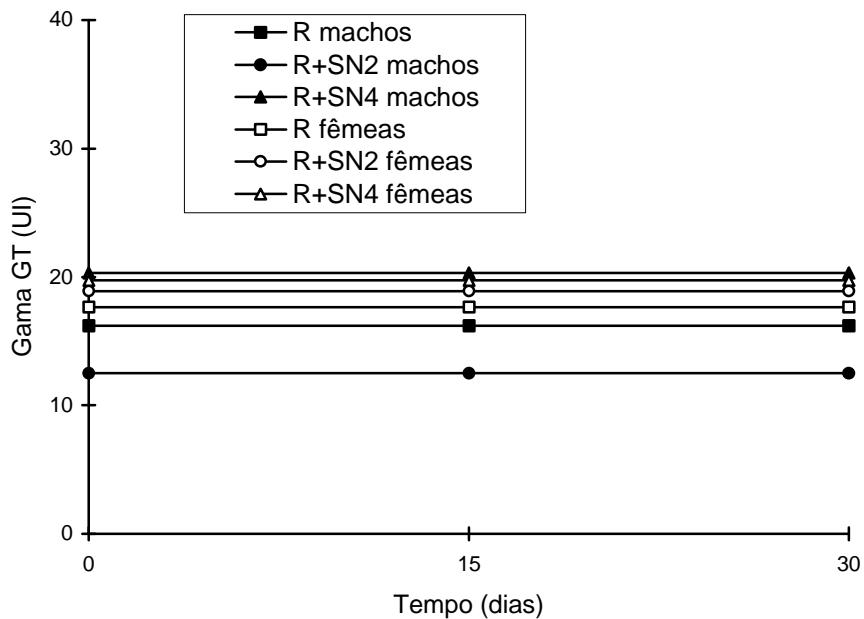


Figura 35- Valores médios de gama-GT, em UI, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas, em função do tempo.

A figura 35 mostra que todos os grupos não apresentaram resultados estatisticamente significativos em função do tempo. Isto sugere que os compostos testados na dose de 100mg não afetaram o transporte dos aminoácidos.

Quadro 15 – Valores médios de TGP, em UI, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | Machos | | Fêmeas | |
|--------------|--------------------------|-----------|---------------|-----------|---------------|
| | | Média | % de variação | Média | % de variação |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 192,00 Aa | | 120,00 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 86,53 Aa | -54,93 | 87,17 Aa | -27,36 |
| | G ₃ R + SN4 | 192,00 Aa | 0 | 120,00 Aa | 0 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 229,00 Aa | | 130,33 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 80,00 Aa | -65,07 | 135,33 Aa | +3,84 |
| | G ₃ R + SN4 | 298,66 Aa | +30,42 | 286,00 Aa | +119,44 |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 133,00 Aa | | 140,33 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 63,00 Aa | -52,63 | 72,66 Aa | -48,22 |
| | G ₃ R + SN4 | 156,33 Aa | +17,54 | 139,50 Aa | -0,59 |

Em cada dieta, A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada sexo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O quadro 15 revela a análise estatística dos valores de concentração de TGP durante todo o período do experimento.

Durante todo o experimento coelhos machos não apresentaram resultados estatisticamente significativos em relação à coelhos fêmeas. Os valores médios de TGP para o grupo de coelhos machos não foram estatisticamente significativos nos tempos 0, 15 e 30 dias, quando comparados às fêmeas e dentro do mesmo sexo quando se compara os diferentes tratamentos os resultados também não são estatisticamente significativos. No entanto taxas de variações expressivas foram encontradas para os coelhos fêmeas do grupo SN4 aos 15 dias. Um aumento de 119,44% neste parâmetro foi observado quando comparado o grupo 3 das fêmeas com o grupo 1 controle. Aos 30 dias o grupo 2 de coelhos machos onde o

composto SN2 foi administrado apresentou uma redução de 52,63% na concentração deste constituinte entre os coelhos machos quando comparado ao grupo 1 controle, já entre os coelhos fêmeas no grupo 2 foi observado uma redução um pouco menor de 48,22% da concentração de TGP quando comparado ao grupo 1 controle.

As transaminases são enzimas que promovem a transferência do grupo NH_2 dos aminoácidos para cetoácidos.

A alanina-aminotransferase também denominada transaminase glutâmico-piruvica (TGP) promove a interconversão do ácido pirúvico+ ácido glutâmico à alanina + ácido alfa-cetoglutárico.

De maneira similar as aspartato aminotransferase, a enzima alanina aminotransferase possui seu mecanismo de ação dependente da coenzima piridoxal-fosfato, um derivado da vitamina B_6 que está presente de modo geral em muitas reações envolvendo α -aminoácidos. Como já citado anteriormente o piridoxal-fosfato funciona como um carreador dos grupos-amino dos aminoácidos. Esta coenzima é reversivelmente transformada da sua forma aldeídica para a forma aminada (BHAGAVAN, 1977).

A enzima TGP é considerada específica para o fígado e seus níveis séricos são ótimos indicadores de injúrias hepáticas. Em coelhos concentrações elevadas de TGP também estão presentes no músculo cardíaco (HOFFMANN, et al., 1989).

Em experimentos com indução de necrose hepática por norepinefrina é observado o aumento dos níveis de alanina aminotransferase de níveis de 19 U/L para 200 U/L. após 48 horas de infusão (Lee et al., 1989).

Os valores normais das transaminases no soro de humanos podem oscilar entre 5 e 20 U/mL. Mitruka e Rawnsley (1981) demonstraram que em coelhos os valores de TGP apresentam-se entre 65,70 U/L para coelhos machos e 62,50 U/L para coelhos fêmeas.

De acordo com a literatura todos os valores de TGP obtidos apresentaram-se acima dos índices normais, sendo mais elevados nos grupos onde o composto SN4 foi administrado, tanto entre machos como entre fêmeas na dosagem aos 15 e 30 dias.

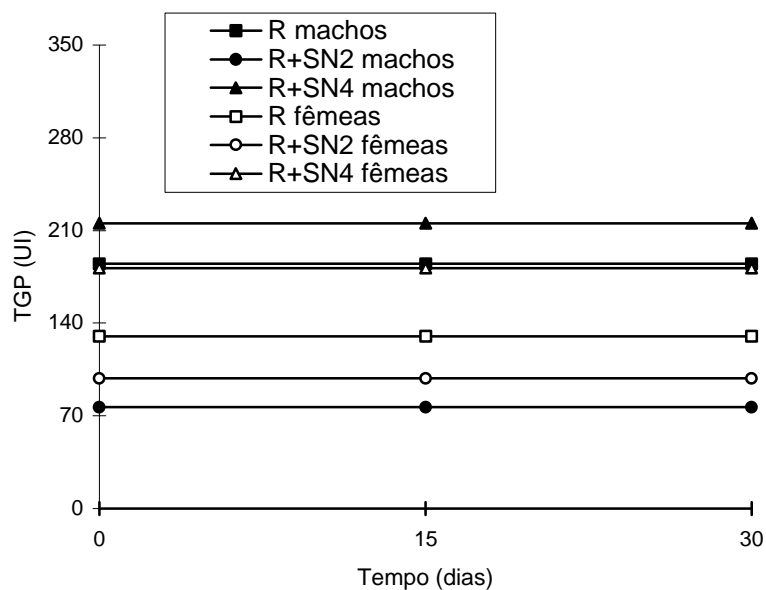


Figura 36- Valores médios de TGP, em UI, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas, em função do tempo.

A figura 36 mostra que todos os grupos não apresentaram resultados de concentração de TGP estatisticamente significativos em função do tempo.

Quadro 16 – Valores médios de TGO, em UI, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | Machos | | Fêmeas | |
|--------------|--------------------------|-----------|---------------|-----------|---------------|
| | | Média | % de variação | Média | % de variação |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 57,22 Aa | | 54,58 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 57,22 Aa | 0 | 54,57 Aa | -0,02 |
| | G ₃ R + SN4 | 40,00 Aa | -30,09 | 60,00 Aa | +9,93 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 436,33 Aa | | 123,66 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 156,00 Aa | -64,25 | 156,00 Aa | +26,15 |
| | G ₃ R + SN4 | 681,67 Aa | +56,23 | 464,33 Aa | +275,49 |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 69,66 Aa | | 130,00 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 55,50 Aa | -20,33 | 23,67 Aa | -81,79 |
| | G ₃ R + SN4 | 161,00 Aa | +131,12 | 229,00 Aa | +76,15 |

Em cada dieta, A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada sexo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O quadro 16 revela a análise estatística dos valores de concentração de TGO encontrados nas dosagens realizadas durante todo o período do experimento.

Durante todo o experimento coelhos machos não apresentaram resultados estatisticamente significativos quando comparados a coelhos fêmeas. Os valores médios de TGO não foram estatisticamente significativos quando se comparou machos e fêmeas e dentro do mesmo sexo quando se comparou os diferentes tratamentos. Porém aos 15 dias, pela análise da taxa de variação os coelhos fêmeas do grupo 3 onde o composto SN4 foi administrado apresentaram um aumento de 275,49% deste parâmetro quando comparada ao grupo 1 controle. No grupo de machos onde esta mesma substância foi utilizada observou-se um aumento de 56,23%, demonstrando assim valores de TGO elevados. Aos 30 dias os grupos de coelhos machos e fêmeas que foram tratados com o composto SN4

continuaram apresentando níveis elevados de TGO. O grupo 3 de machos apresentou um aumento deste parâmetro em 131,12% quando comparado ao grupo 1 controle. Já no grupo das fêmeas que receberam este mesmo tratamento o aumento observado foi de 76,15%.

As transaminases são enzimas que promovem a transferência do grupo NH_2 dos aminoácidos para cetoácidos. A Aspartato aminotransferase também denominada glutamato-oxaloacetato transaminase (TGO) promove a interconversão do ácido L-glutâmico + ácido oxaloacético a ácido alfa cetoglutárico + ácido L-aspartico (BHAGAVAN, 1977).

As reações de transaminação possuem seu mecanismo de ação dependente da coenzima piridoxal-fosfato, um derivado da vitamina B_6 que esta presente de modo geral em muitas reações envolvendo α -aminoácidos. O piroxal-fosfato funciona como um carreador dos grupos-amino dos aminoácidos. Esta coenzima é reversivelmente transformada da sua forma aldeídica para a forma aminada. (figura) (BHAGAVAN, 1977).

Esta enzima é encontrada no fígado, coração, músculos esqueléticos, rins e pâncreas, sendo que o aumento da atividade plasmática desta enzima é um indicador de injurias em células e tecidos bem como em órgãos.

A determinação da transaminase glutâmico oxaloacética fornece elementos de grande significação para a determinação do diagnóstico a partir da diferenciação entre enfarte do miocárdio e insuficiência coronária, bem como a confirmação do enfarte do miocárdio quando as alterações do ecocardiograma não são bem definidas, podem avaliar assim a extensão do enfarte. Na anemia aguda, na necrose renal e no cateterismo cardíaco, aumento nos níveis de TGO são observados (Lima, 2001).

O valores normais das transaminases no soro de humanos podem oscilar entre 5 e 20 U/mL. Mitruka e Rawnsley (1981) demonstraram que em coelhos os valores de TGO apresentam-se entre 72,3 UI/L para coelhos machos e 68,1 UI/L para coelhos fêmeas.

Em coelhos em qualquer idade, experimentalmente infectados com *E. stiedae*, teve as concentrações de aspartato aminotransferase aumentadas sem que fosse observado o aumento da alanina aminotrasferase (ABDEL-GHAFFAR et al., 1990).

Trabalhos experimentais onde a hipertermia foi induzida em coelhos adultos onde a temperatura retal média se encontrava em torno de 43,5°C causando estresse revelou que a concentração de aspartato aminotransferase variou de 29,60 U/L para 100,90 U/L (MARDER et al, 1990). Logo pode-se observar que os valores obtidos pelos grupos foram muito acima do normal encontrado na literatura. Estas substâncias na dose de 100 mg podem estar afetando a transaminação de aminoácidos, produzida na presença destas enzimas.

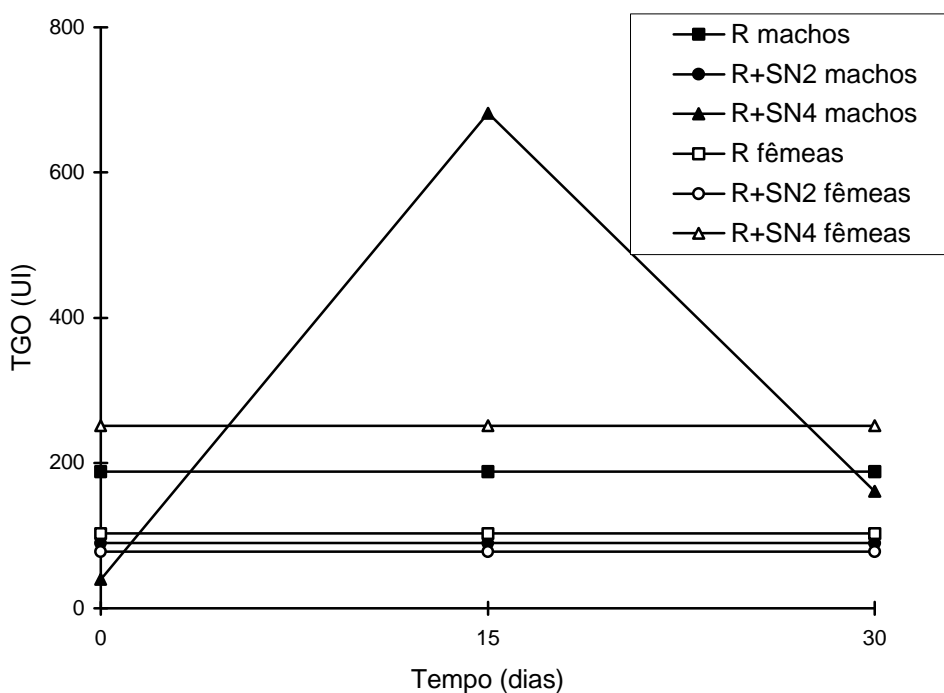


Figura 37 - Valores médios de TGO, em UI, em coelhos tratados com ração + substância-teste em cápsulas, em função do tempo

A figura 37 mostra que somente o grupo de coelhos machos que recebeu o composto SN4 apresentou resultados estatisticamente significativos em função do tempo. A concentração de TGO sérica apresentou um aumento acentuado aos 15 dias retornando, aos 30 dias à valores próximos aos encontrados na dosagem no tempo 0.

Quadro 17 – Valores médios de Ca, em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | Machos | | Fêmeas | |
|--------------|--------------------------|-----------|---------------|----------|---------------|
| | | Média | % de variação | Média | % de variação |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 20,36 Aa | | 27,23 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 11,95 Aa | -41,31 | 14,20 Aa | -47,85 |
| | G ₃ R + SN4 | 20,36 Aa | 0 | 27,23 Aa | 0 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 20,36 Ab | | 27,23 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 36,25 Aa | +78,05 | 30,10 Aa | +10,54 |
| | G ₃ R + SN4 | 30,10 Aab | +47,84 | 35,27 Aa | +29,53 |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 11,95 Aa | | 14,20 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 9,72 Aa | -18,66 | 12,83 Aa | -9,65 |
| | G ₃ R + SN4 | 11,48 Aa | -3,93 | 11,70 Aa | -17,61 |

Em cada dieta, A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada sexo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O quadro 17 revela a análise estatística dos valores das concentrações de cálcio encontrados nas dosagens realizadas durante todo o período do experimento.

Durante todo o ensaio biológico, coelhos machos não apresentaram resultados estatisticamente significativos quando comparados a coelhos fêmeas.

A dosagem efetuada no tempo 0 dias, revelou resultados estatisticamente não significativos entre as dietas. Este resultado foi satisfatório uma vez que nenhum dos animais havia recebido dietas diferentes no período antecedente a dosagem bem como revela a homogeneidade destes animais no que se diz respeito à concentração de Cálcio sanguíneo.

A dosagem de 15 dias pode revelar valores de concentração de cálcio estatisticamente significativos no grupo de coelhos machos entre os diferentes tratamentos administrados. O grupo de coelhos machos que recebeu o composto SN2 incorporado a sua dieta apresentou concentração de cálcio maiores 78,05% em comparação ao grupo controle. No grupo de machos onde foi administrado o composto SN4 apresentou uma taxa de variação 47,84% maior quando comparado ao grupo controle.

Entre as fêmeas não foram observados resultados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo 1 controle. No entanto o grupo de fêmeas que recebeu o composto SN4 apresentou um aumento na taxa de variação de 29,53% quando comparado ao grupo controle. Ao 30 dias pode se observar que todos os grupos não apresentaram resultados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo 1 controle, e revelando parâmetros próximos à normalidade no final do experimento.

Diversos processos anormais a um organismo saudável tais como hiperparatireodismo, hipervitaminose D, neoplasias, fraturas ósseas, síndrome nefrótica, etc... Podem ser revelados a partir da observação de alterações nas taxas plasmáticas de cálcio. Desta forma sua análise torna-se um parâmetro de suma importância para em ensaios biológicos toxicológicos.

O mineral cálcio sofre a influência de hormônios como o paratireóidico, a calcitonina e 1,25 dihidroxicalciferol. Estes uma vez promovem o controle do fluxo de Ca^{+2} entre os líquidos extracelulares e intracelulares, através das membranas celulares específicas e membranas de organelas intracelulares (SMITH e BANKS, 1986)

O cálcio está presente principalmente no esqueleto humano constituindo cerca de 1,5 a 2% do peso corpóreo, porém, este também desempenha numerosas funções não relacionadas à estrutura óssea. A concentração de Ca^{+2} no líquido intracelular é de cerca de 0,2 g/kg de tecido, enquanto varia de 8,8 a 10,4 mg/dl no sangue.

A presença do íon cálcio na atividade de numerosos sistemas enzimáticos lhe confere um grau de suma importância em processos como os responsáveis pelas propriedades de contração muscular, transmissão de impulsos nervosos, resposta à atividade neural, mecanismo de coagulação sanguínea e a regulação de batimentos cardíacos. Muitos destes efeitos são

mediados por uma proteína específica de ligação do cálcio, a calmodulina. A concentração intracelular de Ca^{+2} também desempenha um importante papel na modulação de secreção de vários hormônios e na liberação de certas enzimas, como por exemplo a amilase das glândulas salivares (SMITH, et al., 1998).

Um aumento significativo de cálcio sérico pode causar insuficiência cardíaca ou respiratória, uma diminuição pode resultar em tetania. O cálcio ionizado, ao iniciar a formação da coagulação sanguínea, estimula a liberação de tromboplastina das plaquetas do sangue (MAHAN, 1995).

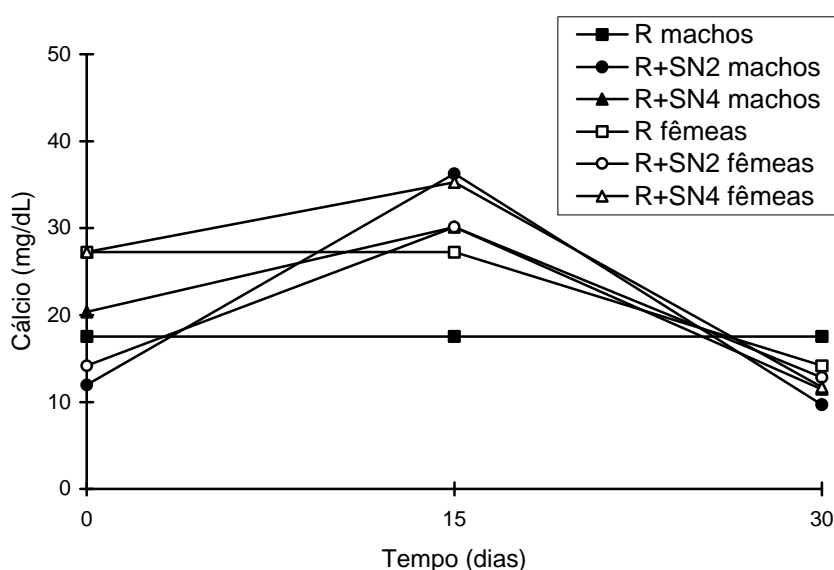


Figura 38 –Valores médios de cálcio , em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas, em função do tempo.

A figura 38 revela que apenas o grupo controle de coelhos machos não apresentou resultados estatisticamente significativos. O grupo controle de coelhos fêmeas apresentou uma redução acentuada na concentração de cálcio aos 30 dias. Os demais grupos apresentaram um aumento deste constituinte aos 15 dias e uma redução acentuada aos 30 dias.

Quadro 18– Valores médios P, em mg/dL, em coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas

| Tempo (dias) | Dieta | Machos | | Fêmeas | |
|--------------|--------------------------|---------|---------------|---------|---------------|
| | | Média | % de variação | Média | % de variação |
| 0 | G ₁ Ração (R) | 7,81 Aa | | 6,74 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 7,16 Aa | -8,32 | 6,92 Aa | +2,67 |
| | G ₃ R + SN4 | 7,98 Aa | +2,18 | 5,57 Ba | -17,36 |
| 15 | G ₁ Ração (R) | 9,05 Aa | | 8,12 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 5,92 Bb | -34,59 | 8,25 Aa | +1,60 |
| | G ₃ R + SN4 | 8,91 Aa | -1,55 | 8,69 Aa | +7,02 |
| 30 | G ₁ Ração (R) | 7,16 Aa | | 6,92 Aa | |
| | G ₂ R + SN2 | 6,04 Aa | -15,64 | 7,07 Aa | +2,17 |
| | G ₃ R + SN4 | 6,41 Aa | -10,47 | 7,14 Aa | +3,18 |

Em cada dieta, A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada sexo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O quadro 18 revela a análise estatística dos valores de concentração de fósforo encontrados nas dosagens realizadas durante todo o período do experimento.

No tempo 0 dias observou-se resultados estatisticamente significativos quando a comparação entre coelhos machos são comparados à coelhos fêmeas somente no grupo 3 onde posteriormente foi administrado o composto SN4. Em cada sexo as dietas não apresentaram resultados estatisticamente significativos. Estes resultados foram satisfatórios uma vez que nenhum dos animais havia recebido tratamento diferenciado até que fosse efetuada essa dosagem.

Aos 15 dias a dosagem efetuada revelou que em cada tratamento, somente o grupo 2 que recebeu o composto SN2 apresentou resultados estatisticamente

significativos quando comparados ao grupo 3 de coelhos fêmeas. Em cada sexo, os tratamentos apresentaram resultados estatisticamente significativos entre os coelhos machos. Os animais pertencentes ao grupo 3 que recebeu o composto SN2 apresentaram a concentração de fósforo sérica 34,59% menor quando comparada a concentração observada do grupo controle. Entre as fêmeas não foi observado resultados estatisticamente significativos entre os diferentes tratamentos administrados. Aos 30 dias não foram observados resultados estatisticamente significativos entre as dietas, em cada sexo bem como em cada dieta entre os sexos.

O fósforo no organismo se encontra preferencialmente no interior da célula. Fósforo sérico existe principalmente na forma inorgânica de fosfato. A concentração sérica de fósforo inorgânico é influenciada pela de vitamina D, níveis de calcitonina e paratormônio, dieta, balanço ácido base, função renal e concentração de íons cálcio presente. Diferentes níveis de fósforo podem ser encontrados em animais de sexos diferentes bem como raças diferentes. Valores da concentração de fósforo, descritos na literatura, variam entre 1 a 5 mg/dL para coelhos (YU et al., 1979; CAISEY and KING, 1980). Em nosso trabalho este valor encontra-se um pouco maior nos grupos controles, este fato pode ser explicado como por exemplo, pela diferença de dieta administrada. Os valores obtidos não foram considerados tóxicos.

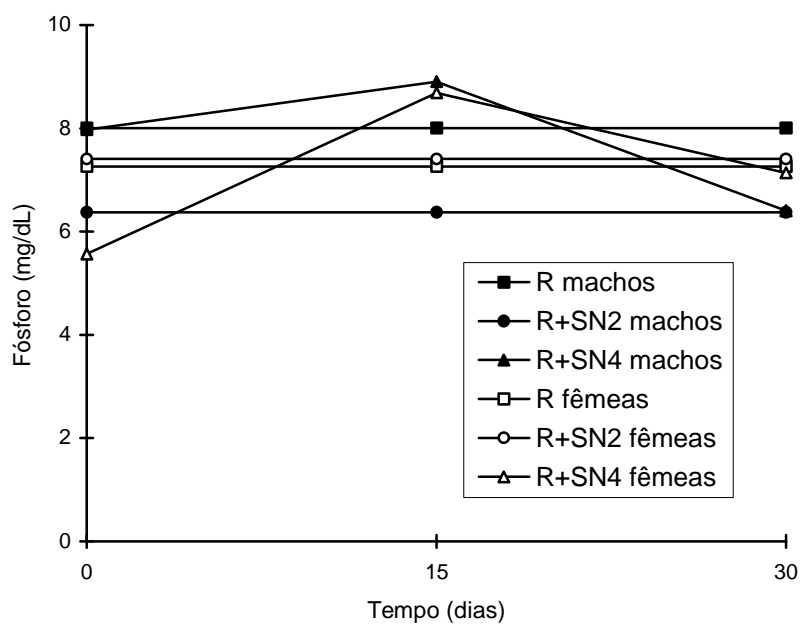


Figura 39 – Valores médios de fósforo, em mg/dL, de coelhos tratados com ração + substancia-teste em cápsulas, em função do tempo.

A figura 39 mostra que apenas os grupos que receberam o composto SN4 apresentaram resultados estatisticamente significativos em função do tempo. A concentração de fósforo apresentou um aumento aos 15 dias e uma pequena redução aos 30 dias nestes grupos.

5-CONCLUSÕES GERAIS

A complexação do flavonóide rutina com os organoestânicos $[\text{SnCl}_2\text{Ph}_2]$, $[\text{SnClPh}_3]$, $[\text{SnCl}_3\text{Ph}]$, $[\text{SnCl}_4]$ originou os complexos de fórmula igual à $[\text{SnCl}_2\text{Ph}_2(\text{Rut})]\cdot\text{H}_2\text{O}$, $[\text{SnClPh}_3(\text{Rut})]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $[\text{SnClPh}(\text{Rut})]\cdot\text{H}_2\text{O}$, $[\text{SnCl}(\text{Rut})]\cdot\text{H}_2\text{O}$, respectivamente. A caracterização destes compostos foi efetuada a partir da análise elementar (CHN), ponto de fusão, espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^{119}Sn . Os resultados de CHN em combinação com a análise por espectroscopia no infravermelho sugerem que todos os complexos sintetizados possuam moléculas de H_2O em sua composição.

Em posse dos complexos sintetizados promoveu-se a realização de dois ensaios biológicos. O primeiro ensaio efetuou a análise do potencial hipolipidêmico destas substâncias. Para fins de comparação e avaliação do efeito hipolipidêmico, utilizou-se também neste ensaio, o flavonóide rutina isoladamente e o princípio ativo atorvastatina cálcica presente no medicamento liptor. Estes compostos foram encapsuladas utilizando talco farmacêutico como veículo.

Os complexos, bem como o flavonóide rutina e a atorvastatina cálcica foram testados no metabolismo de coelhos machos da raça Nova Zelândia Branco, com hiperlipidemia induzida por colesterol (0,5%) + ácido cólico (0,1%) (administrados na ração dos animais).

A dosagem estabelecida para todos os animais foi de 5mg/dia das substâncias em questão.

Todos os complexos foram eficientes na redução de colesterol total, sendo o mais eficiente o complexo $[\text{SnCl}(\text{Rut})]\cdot\text{H}_2\text{O}$. Seus resultados puderam ser comparados com os apresentados pela atorvastatina cálcica, princípio ativo muito utilizado no mercado farmacêutico.

A lipoproteína colesterol-HDL apresenta um efeito cardioprotetor satisfatório, portanto a elevação deste constituinte é desejada. O complexo que promoveu um maior aumento deste parâmetro foi o $[\text{SnClPh}_3(\text{Rut})]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ aos 15 dias de tratamento. Entretanto um efeito contrario em relação a lipoproteína colesterol-LDL é esperado, uma vez que este constituinte promove o transporte

do colesterol do fígado para os tecidos, sendo um forte determinante nos processos de formação da placa aterosclerótica. O complexo $[\text{SnCl}(\text{Rut})].\text{H}_2\text{O}$ apresentou maior redução deste constituinte aos 15 dias e aos 30 dias o melhor resultado foi apresentado pelo complexo $[\text{SnClPh}_3(\text{Rut})].6\text{H}_2\text{O}$.

Quanto à redução na concentração de triacilgliceróis, estes compostos não apresentaram resultados muito satisfatórios. Este fato indica que estes complexos possivelmente seriam mais apropriados na utilização como agentes hipocolesterolêmicos.

No segundo ensaio biológico foram avaliados os efeitos tóxicos dos complexos $[\text{SnClPh}_3(\text{Rut})].6\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{SnCl}(\text{Rut})].\text{H}_2\text{O}$. Utilizaram-se coelhos machos e fêmeas para efetuar o teste de cada substância na concentração de 100 mg/dia.

Os constituintes do colesterol total, triacilgliceróis, colesterol-HDL, glicose, proteínas totais, albumina, bilirrubina total, uréia, ácido úrico, fósforo, cálcio, gama glutamil transferase (Gama-GT) e as transaminase glutâmico-piruvica (TGP) e transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) foram dosados neste ensaio biológicos. Nesta dosagem estas substâncias não apresentaram efeitos hiperlipidêmicos. As concentrações lipídica sanguínea apresentaram uma elevação considerável. As concentrações das transaminase glutâmico-piruvica (TGP) e transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) apresentaram-se elevadas. Este resultado sugere que estes compostos podem estar afetando a transaminação de aminoácidos. A concentração de ácido úrico também foi elevada. Para os outros constituintes, estes compostos não apresentaram efeitos tóxicos.

Este trabalho demonstrou os efeitos benéficos dos complexos sintetizados. A complexão da rutina com organoestânicos promoveu um aumento nas propriedades hipolipidêmicas deste flavonóide, porém, novas pesquisas devem ser realizadas para que estes compostos possam ser utilizados como medicamentos.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-GHAFFAR, F., MARZOUK, M., ASHOUR, M. B., AND MOSAAD, M. N. Effects of eimeria labbeana and Estiedai infection on the activity of some enzymes in the serum and liver of their hosts. **Parasitol. Res.** 70, p. 440-443, 1990.
- AVERT Divulgação dos dados do estudo **AVERT (Atorvastatin Versus Revascularization Treatments)** AHA's 71 st Scientific- 11-11-1998 Dallas, Texas.
- BATLOUNI, M. Hipótese oxidativa da arteriosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronária. **Artigos Brasileiros de Cardiologia**, v. 68, n. 1, p. 55-63, 1997.
- BEYMAN, A.C. Rabbit: A source of healthful meat? **Journal Appl Rabbit Research**, vol.7, p 281-296, 1984.
- BHAGAVAN, N. V. Bioquímica. **Rio de Janeiro, RJ: Interamerican, 1977.**
- BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos.** São Paulo: Varela, 1995. 223p.
- BORTOLOTTI, A., CASTELLI, D. and BONATI, M. Hematology and chemistry values of adult, pregnant and newborn New Zealand White rabbits. **Lab. Anim. Sci.** vol 39. p. 437-439.
- BORREGO, F. Propriedades de los flavonóides y otros componentes de los frutos cítricos. En Najaray salud. Valencia-Espanã: **Fundación Valenciana de Estudios Avanz**, 350p.1995.
- BOSTOM, A.G, et al. Elevated Plasma Lipoprotein (a) and Coronary Heart Disease in men aged 55 years and younger. **JAMA.** 276: 544-548. 1996.

- BREWER, H.B. et al. Apolipoproteins and lipoproteins in human plasma: An overview. **Clinical Chemistry**. 34: B4-B7. 1998.
- BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas, SP:editora da Unicamp. 1994.
- BRUSS, M. L., BOURDEAU, J. E. Calcium balance in laboratory rabbits. *Miner Electrolyte metab.* V.10, pp. 127-132, 1983. GONZALES, J. HIDALGO, F., ESTELLER, A., LOPEZ, M. A. The effect of biliverdin and bilirubin on the hepatic excretion of bile pigments in the rabbit. **Comp. Biochem. Physio.** A 74, pp.67-70, 1983.
- CAISEY, J. D., KING, D. J. Clinical chemical values for some common laboratory animals. **Clin. Chem.** Vol. 26, pp.1877-1879, 1980.
- CARUSO, F., GIOMINI, M., GIULIANI, A. M., RIVAROLA, E. Synthesis spectroscopic (Mössbauer, IR and NMR) and X-ray structural studies of diorganotin complexes of 2,2'-bipyrimidine and further NMR studies of diorganotin-pyrazine and- 2,2'-azopyridine complexes. **Journal of Organometallic chemistry**. 506, pp. 67-76, 1996.
- CARUSO, F., LEONESI, D., MARCHETTI, F. RIVAROLA, E., ROSSI, M., TOMOV, V., PERTTINARI, C. Tin (IV) and organotin (IV) derivatives of anionic 4-acyl-5-pyrazolonato ligands: synthesis, spectroscopic characterization (IR, far-IR, ^{119}Sn Mössbauer, ^1H , ^{13}C , and ^{119}Sn NMR) and behavior in solution Crystal and molecular structure of trans-diphenylbis[1-phenil-3-methyl-4-(4-bromobenzoyl)-pyrazolon-5-ato]tin(IV). **Journal of organometallic chemistry**. 519, pp. 29-44, 1996.
- CHEEKE, P. R. **Alimentación y nutrición Del conejo**. Zagagoza, ES: Ascribia, 465 p., 1995.

- CHEUNG, Marian C. effects of a diet restricted in saturated fatty acids and cholesterol on composition of apolipoprotein A-I-containing lipoprotein particles in the fasting and fed states. **Am. J. Clin. Nutr.** 60; 911-8 1994
- COOK, N.C., SAMMAN, S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources - review. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 1, p. 66-76, 1996.
- COVAZIER, E., MACLOUF, J. Interference of some flavonoids and non-inflammatory drugs with oxidative metabolism of arachidonic acid by human platelets and neutrophils. **Biochimica et Biophysica Acta** 835, pp. 315-321, 1985.
- CROWE, A. J. **Metal Compounds in Cancer Therapy**, ed. Chapman & Hall, London, p. 149-179, 1994.
- FARMER, U. A., GOTTO, A. M., Risk factors coronary diseases. I: BRAUNWALD, E., **A Textbook of cardiovascular medicine**. Philadelphia: W B Saunders, p. 1135-1139, 1992.
- FERRÁNDIZ, M.L., ALCARAZ M.J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents and Actions**, vol. 32, 1991.
- FIELDING, J.F., FIELDING, P.E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. **Journal of lipid research**. 36: 211-228. 1995.
- FILGUEIRAS, C. A. L.; HOLLAND, P. R.; JOHNSON, B. F. G.; RAITHBY, P. R.; **Acta Cyst.**, B 38 p.2684,1982.
- FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chem. Toxicol.** V. 33 (12). 1061-1080. 1995.

FOX, R. R. and LAIRD, C. W. Biochemiscal parameters of clinical significance in rabbits. II- Diurnal variations. **J. Hered.** 61 p. 265-268. 1970.

FOX, R. R. The rabbit. **In: Clinical Chemistry of Laboratory Animals.** (W. F. Loeb and F. W. Quimby, eds), pp. 41-46. Pergamon. New York.

GAROUFIS, A., KOUTSODIMOU, A., RAPTOPOULOU, C. P. SIMOPOULOS, A. KATSAROS, N. Organotin(IV) complexes with 2-(2'-pyridyl)quinoxaline (L). The crystal structure of the $[\text{SnEt}_2\text{Cl}_2\text{L}] \cdot 0,5$ benzene. **Polyhedron**, 18, pp. 3005-3012, 1999.

GINSBERG, H.N. Lipoprotein metabolism and its relationship to atherosclerosis. **Medical Clinics of North America.** WB Saunders. 1 - 20. 1994.

GOLDBERG, A.N., SCHONFELD, G. Effects of diet on lipoprotein metabolism. **Annual Review Nutrition**, vol.5, p.195-212. 1985

GOODMAN e GILMAN. **As bases farmacológicas da Terapêutica.** vol 1. 1996.

GOTTO, A. M. Overview of a current issues in dyslipidemias. **American Jornal cardiology**, vol. 71, p. 254, 1992..

GRIGLEWSKI, J. R.; KORBUT, R.; ROBAK, J.; SWIES, J. On mechanism of antithrombotic action of flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, vol. 36, n. 3, p. 317-322, 1987.

GRINBERG, N. L., RACHMILEWITZ, A. E., NEWMARK H., Protetive effects of Rutin against hemoglobin oxidation, **Biochemical Pharmacology**, Vol. 48, No. 4, pp. 643-649, 1994.

GRUNDY, S.M. **Cholesterol and Atherosclerosis.** Philadelphia: J.B.Lippincott Company, Philadelphia. 1990.

HAPER, H.A., RODWELL, V. W., MAYES , P. A. **Química farmacêutica**. São Paulo: Atheneu, 736 p.1994.

HOFFMANN, W. E., KRAMMER, J., MAIN A. R., TORRES, J. L. **Clinical enzymology**. In: LoEB, W. F., QUIMBY, F. W. (Eds). The Clinical Chemistry of laboratory Animals. New York; Pergamon, p.237-278, 1989.

HOLZRICHTER, D., MEISS, L., BEHRENS, S. and MICKLEY, V. The rise of blood sugar as an additional parameter in traumatic shock. **Arch. Arthrop. Trauma Sug.** 106, p. 319-322, 1987.

IRFAN, M. The eletrophoretic pattern of serum proteins in normal animals. **Res. Vet. Sci.** vol. 8. p. 137-142, 1967.

JAKUBÓW, K. and GROMADZKA-OSTROWKSA, J. Twenty-four hour changes in lisozymas levels, total plasma proteins concentration, gamma-globulin concentration, white blood cell count and numbers of lymphocytes and granulocytes in the peripheral blood of chinchillas *Chinchilla laniger* M. and rabbits *Oryctolagus cuniculus* L. **Comp. Biochem. Physiol.** A 86, p. 109-112. 1987.

JEFFERY, P. G., HUTCHISON, D. **Chemical methods of rock analysis**. Third edition. Pergamon Press, Oxford. New York.

KELLIS, J. T. e VICKERY L. E. **Science** Vol 225: p. 1032-4, 1984.

KIRK, E. A., SUTHERLAND, P., WANG, S. A., CHAIT, A.,LEBOEUF, R. C. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and artherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL-receptor deficient mice. **Journal of Nutrition**, vol. 128. p. 954-64. 1998.

KOZMA, C., MACKWIN, W., CUMMINS, L. M., MAUER, R. The anatomy, physiology and biochemistry of rabbits. In: Weisbroth, S. H., Flatt, R. E., Kraus, A. L. (Eds). **The biology of the laboratory rabbits**. New York: Academy Press, p. 50-72, 1974.

KRAUSE, M. V., MAHAN, L. K., ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos nutrição e dietoterapia**. 9º ed. São Paulo:Roca, 117p, 1995.

LALE, A.; HERBERT, J.M. Ability of different flavonoids to inhibit the procoagulant activity of adherent human monocytes. **J. Nat. Prod.** 59, 273-276. 1996.

LEE, J. C., SAUNDERS, G. K., and SPONENBERG, D. P. Hepatic necrosis induced by norepinephrine in rabbits. **Pro. Soc. Exp. Biol. Med.** 185 p. 462-468. 1989.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2 ed. São Paulo; Sarvier, 839 p.,1995.

LIMA, A. O., SOARES, B. J., GREGO, J. B., GALIZZI, J., CANÇADO, J. R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica. Técnica e interpretação**. 6 ed. Rio de Janeiro: KOOGAN, 543p. 1985.

LIMA. G M., Síntese e caracterização de compostos organometálicos de estanho (IV), **Química Nova**, vol.22, n.2, 1999.

LIMA, L. R. P. **Efeitos farmacológicos e toxicológicos e mecanismo de ação dos flavonóides e corantes naturais extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) no metabolismo lipídico de coelhos**. Viçosa MG:UFV, 2001.

MAIA, J., R. S. **A dessulfuração de N-Sulfinilarilaminas catalizadas por sais de metais de transição**. Instituto de ciências exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1990.

MANGIAPANE, H., THOMPSON, J, SLATER, A., BROWN, S., BELL, G. D.
The inhibition of oxidation of low-density-lipoprotein by catechin, a naturally occurring flavonoid. **Biochemical Pharmacology**, vol. 43, n 3, 1993.

MANN J., **Secondary metabolism**, second edition, Oxford chemistry series:33,
p.p: 275-276; 1986.

MARDER, J., EYLATH, U., MOSKORTZ, E. and SHARIR, R. The effect of heart exposure on blood chemistry of the hypertermic rabbit. **Comp. Biochem. Physiol. A** 97, p. 245-247, 1990.

MERCK INDEX, Tenth edition

MITRUKA, B. M., RAWNSLEY, H. M. **Clinical biochemistry and hematological references value in normal experimental animals and normal humans**. 2 ed. New York: Masson, 1981.

MONTEIRO, J. B. R., ROSADO, L. E. F. P. L. **Nutrição e doenças cardiovasculares**. Viçosa, MG: UFV, 52p., 1993.

MUÑOZ, M. E., GONZÁLEZ, J., ESTELLER, A. Effect of glucose administration on bilirubin excretion in rabbit. **Experientia** 43, pp. 166-168, 1987.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**, 5 ed, 1997.

NATH, M., YADAV, R., ENG, G. NGUYEN, T. T. KUMAR, A. Characteristic spectral studies, and antimicrobial and anti-inflamatóry activities of diorganotin (IV) derivates of dipeptides. **Journal of Organometallic Chemistry**, 577, 1-8 ,1999.

NOTTER, D. Bilirubin. In: Interpretation of Clinical Laboratory Tests. (SEIST, G., HENNEY, F., YOUNG , D. S., eds). **Biomedical Publ.**, pp. 146-163. Foster city California. 1985.

- OKUDA, T. Flavonoids. MISTSUHASHI, O., TANAKA, S., NOZOE, M., n.(Eds.)
Chemistry of organic natural products. São Paulo: NAGAI, 1992. 228-9 p.
- PELLERITO, A., FIORE, T., PELLERITO, C., FONTANA, A., Di STEFANO, R.,
 PELLERITO, L, CAMBRIA, M. T., MANSUETO, C. organometallic
 complexes with biological molecules. XI. Solid state and vivo investigations
 of some diorganotin(IV)-choramphenicol and cycloserine derivatives.
Journal of Inorganic Biochemistry 72 pp. 115-125, 1998
- PELZER, L.E; GUARDIA, T; JUAREZ,A.O; GUERREIRO,E. Acute and chronic
 antiinflammatory effects of plant flavonoids. **II Farmaco**. 53, 421-424. 1998
- PEREIRA, L. W. **Efeito hipolipidêmico de flavonóides, corantes naturais e
 suas associações**. Viçosa Mg:UFV, 1999.
- PÉRGORIER, J. P., DUÉE, P. H., GIRARD, J. R. Contribution of hepatic fatty
 acid oxidation and exogenous galactose supply to regulation of glucose
 homeostasis in the newborn rabbit. **Biol. Neonate**. Vol. 51, p. 31-39. 1987
- PETERSDORF, R.G., ADAMS, R.D.; BRAUNWALD, E., ISSELBACHER, K.J.;
 MARTINS, J.B., WILSON, J.D. **Harrison-medicina interna**. Vol 1.1407p.,
 1984.
- PETERSON, J. e DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical
 activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12,p. 1995-2018, 1998.
- RAO, D. R., CHAWAN, C.B., CHEN, C.P.SUNKI, G. R. Nutritivi value of rabbit
 meat. In "The domestic rabbit:Potentials, Problems, and current
 research"(P.R. Cheke, ed.), **OSU Rabbit Research**, p. 53-59, 1979.
- ROTH, S. I. And CONAWAY, H. H. Spontaneus diabetes mellits in the New
 Zealand White rabbit. **Am. J. Pathol**. 109 p. 359-363. 1982.

SALVAYRE, A. N., AFFANY, A., HARITON, C., SALVAYRE, R., Additional Antilipoperoxidant Activities of Alpha-Tocoferol and Ascorbic Acid on Membrane- like Systems are Potentiated by Rutin. **Pharmacology** vol. 42, pp.262-272, 1991.

SANDEEP, C.; PILLAI, K. K.; HUSSAIN, S. Z; DIPAK, K. G. Propolis protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. **Experimental and molecular pathology** vol. 62, p.190-198, 1995.

SCHRAMM, D. D.,GERMAN, J. B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. **Jornal Nutrition Biochemistry**, vol. 9, p. 560-566, 1998.

SASKIA, A. B. E., TROMP, L. J. N. M., HAENEM, M. M. R. G., VAN DER VIJGH, F. J. W., BAST, A. Flavonoids as Scavengers of Nitric Oxide Radical. **Biochemistry and Biophysical Research Communications**, Vol. 214, no. 3, pp. 755-759, 1995.

SASKIA, A. B. E. VAN ACKER, VAN BALEN G. P., BERG D., BAST, A., VAN DER VIJGH, F. J. W. Influence of Iron Chelation on the Antioxidant Acitivity of Flavonois. **Biochemical Phamacology**, vol. 56, pp. 935-943, 1998.

SCHRAMM, D. D., GERMAN, J.B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular diseases. **Journal Nutrition Biochemistry**, pp. 560-566, 1998.

SHRAMM, D. D.; G. BRUCKNER; BOISSONNEAULT G. A. **Fasel J.** 10 (Abstract :A 461), 1996.

SHRIVER, D. F., JONHSON, M. P., Inorga. Chem. v. 6, p. 1265, 1967.

Site atorvastatina- www.stickydata.com/work/porttolio/ci/specialty/mono

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Consenso brasileiro sobre dispilidemias Detecção-Avaliação-Tratamento. Arquivos Brasileiros de cardiologia. **Vol. 67,1996.**

STEFOV V., PETRUSEVSKI V. M., AND SOPTRAJANOV B., J. Mol Struct., 293, 97, 1993.

STRYER, L. **BIOQUÍMICA.** 4 ED. Rio de Janeiro:Editora Guanabara, 1000 p, 1996.

SUDHEESH, S.; PRESANNAKUMAR, G.; VIJAYAKUMAR, S.; VIJAYALAKSHMI, N.R. Hypolipidemic effect of flavonoids from Solanum melongena. **Plant. Foods for Human Nutrition.** V. 51 (4) 321-330. 1997.

TOLEDO, T. **Estudo químico e bioquímico de diversas variedades de soja Glycine Max Leguminosae.** Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 197 p.,1994.

WHARF, I., SHRIVER, D. F. **Inorgan. Chem.**, v. 8, p. 914, 1969.

WILLIAN, C. H., HOULT, J. R. S., HARBORNE, J. B., GREENHAM, J. EAGLES, J. A. Biological active lipophilic flavonol from tacacetum parthenium. **Phytochemistry**, v. 38, p. 267-70, 1995.

WRACKMEYER, B. Sn- NMR Parametros, Annual reports on NMR spectroscopy. **vol. 6, 1985.**

YOKAZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z.W.; SHIMIZU, M. Antioxidative activity of flavones and flavonols *in vitro*. *Phytotherapy research.* 11: 446-440. 1997.

- YOTSUMOTO H.; YONAGGUTA, T.; YAMOMATOK, O.;GAWA, Y.; CHA, M. Y.
Inhibition effects of oren-gedaker to and its components on cholesteryl éster synthesis in cultured human, hepatocyte hep G2 cells: Evidence from cultured hep G2 cellus in vitro assay of ACAT. **Planta médica**, vol. 63 p. 141-145, 1997.
- YU, L., PRAGAY, D. A., CHANG, D., WICHER, K. Biochemical parameters of normal rabbit serum. **Cli. Biochem.** V.12, p. 83-87, 1979.

APÊNDICE

Quadro 1 – Resumo da análise de variância dos dados de colesterol, triacilgliceróis, HDL e LDL, de coelhos tratados com diferentes dietas e avaliados aos 0, 15 e 30 dias

| FV | GL | Quadrado médio | | | |
|-------------------|----|------------------|------------------|--------------|-----------------|
| | | Colesterol | Triacilgliceróis | HDL | LDL |
| Dietas (D) | 7 | 1.264.183,00 ** | 1.900,87 ns | 8.260,65 ** | 491.095,30 ** |
| Resíduo-A | 40 | 54.595,05 | 2.143,19 | 1.494,08 | 16.274,70 |
| Tempo (T) | 2 | 16.242.490,00 ** | 7.146,83 ** | 39.166,70 ** | 5.826.470,00 ** |
| D x T | 14 | 433.437,50 ** | 1.522,82 ns | 6.733,88 ** | 164.708,80 ** |
| Resíduo-B | 80 | 27.307,34 | 1.044,21 | 1.339,63 | 14.797,12 |
| CV parcela (%) | | 32,11 | 52,39 | 43,57 | 27,03 |
| CV subparcela (%) | | 22,71 | 36,57 | 41,26 | 25,67 |

** F significativo a 1% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 2 – Desdobramento das dietas D1 e D2 dentro de tempo, para o colesterol, triacilgliceróis, HDL e LDL, de coelhos tratados com diferentes dietas e avaliados aos 0, 15 e 30 dias

| FV | GL | Quadrado médio | | | |
|--------------------|-----|------------------|------------------|--------------|-----------------|
| | | Colesterol | Triacilgliceróis | HDL | LDL |
| D1 vs D2/ tempo 0 | 1 | 1.512,01 ns | 15,87 ns | 109,81 ns | 1.948,20 ns |
| D1 vs D2/ tempo 15 | 1 | 2.500.780,00 ** | 710,40 ns | 7.357,19 * | 1.981.167,00 ** |
| D1 vs D2/ tempo 30 | 1 | 10.023.290,00 ** | 1.755,47 ns | 17.790,01 ** | 1.976.684,00 ** |
| Resíduo combinado | 106 | 36.403,24 | 1.410,54 | - | - |
| Resíduo combinado | 119 | - | - | 1.391,11 | 15.289,65 |

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 3 – Desdobramento de tempo dentro de dietas, para o colesterol, triacilgliceróis, HDL e LDL, de coelhos tratados com diferentes dietas e avaliados aos 0, 15 e 30 dias

| FV | GL | Quadrado médio | | | |
|----------------|----|-----------------|------------------|--------------|-----------------|
| | | Colesterol | Triacilgliceróis | HDL | LDL |
| Tempo/ dieta 1 | 2 | 4.358,62 ns | 471,96 ns | 2.227,10 ns | 4.676,45 ns |
| Tempo/ dieta 2 | 2 | 5.060.876,00 ** | 1.293,65 ns | 1.967,32 ns | 1.403.656,00 ** |
| Tempo/ dieta 3 | 2 | 2.901.515,00 ** | 1.061,10 ns | 25.009,80 ** | 925.738,80 ** |
| Tempo/ dieta 4 | 2 | 2.083.177,00 ** | 1.661,62 ns | 6.099,64 * | 980.995,40 ** |
| Tempo/ dieta 5 | 2 | 2.694.860,00 ** | 501,43 ns | 15.082,67 ** | 575.692,70 ** |
| Tempo/ dieta 6 | 2 | 2.497.079,00 ** | 4.256,25 * | 12.699,02 ** | 1.455.442,00 ** |
| Tempo/ dieta 7 | 2 | 2.021.855,00 ** | 4.436,16 * | 4.845,05 * | 811.315,30 ** |
| Tempo/ dieta 8 | 2 | 2.012.831,00 ** | 4.124,40 * | 18.373,27 ** | 821.916,30 ** |
| Resíduo-B | 80 | 27.307,34 | 1.044,21 | 1.339,63 | 14.797,12 |

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 4 - Resumo da análise de variância do colesterol, triacilgliceróis, HDL, glicose, proteína, albumina e ácido úrico de coelhos avaliados aos 0, 15 e 30 dias

| FV | GL | Quadrado médio | | | | | | |
|-------------------|----|----------------|------------------|--------------|---------------|---------------|------------|-------------|
| | | Colesterol | Triacilgliceróis | HDL | Glicose | Proteína | Albumina | Ácido Úrico |
| Sexo (S) | 1 | 26.965,72 ** | 51.936,79 ns | 9.954,95 ** | 182,7487 ns | 151,9734 ns | 0,5745 ns | 0,000896 ns |
| Dietas (D) | 2 | 45.864,33 ** | 526.607,40 ** | 12.223,49 ** | 2.728,8760 * | 532,3405 ** | 4,6766 ** | 0,080891 ** |
| S x D | 2 | 10.375,32 * | 139.385,20 ** | 12.148,56 ** | 178,1014 ns | 267,8294 * | 1,3435 * | 0,013857 ns |
| Resíduo-A | 12 | 1.703,42 | 18.510,74 | 863,73 | 439,7908 | 42,2806 | 0,3432 | 0,008415 |
| Tempo (T) | 2 | 10.203,86 ns | 144.570,10 ** | 1.625,85 ns | 7.245,5100 ** | 2.561,6540 ** | 94,4494 ** | 0,278946 ** |
| T x S | 2 | 22.184,05 * | 37.594,25 ns | 7.167,17 ns | 105,6202 ns | 96,8196 ns | 0,0128 ns | 0,004891 ns |
| T x D | 4 | 5.698,86 ns | 128.519,30 ** | 7.822,06 ns | 996,4183 ns | 178,1358 * | 3,2862 ** | 0,029374 * |
| T x S x D | 4 | 11.635,75 ns | 59.213,92 ns | 3.494,46 ns | 235,8811 ns | 132,9753 * | 0,6087 ns | 0,036352 * |
| Resíduo-B | 24 | 4.385,61 | 22.688,81 | 3.838,69 | 377,4837 | 44,7851 | 0,3393 | 0,009804 |
| CV parcela (%) | | 24,58 | 47,30 | 43,78 | 12,90 | 9,36 | 9,04 | 40,34 |
| CV subparcela (%) | | 39,44 | 52,37 | 92,28 | 11,95 | 9,63 | 8,99 | 43,54 |

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 5- Resumo da análise de variância de uréia, bilirrubina total, gama-GT, TGP, TGO, cálcio e fósforo de coelhos avaliados aos 0, 15 e 30 dias

| FV | GL | Quadrado médio | | | | | | |
|-------------------|----|----------------|-------------------|------------|--------------|---------------|---------------|-----------|
| | | Uréia | Bilirrubina total | Gama-GT | TGP | TGO | Cálcio | Fósforo |
| Sexo (S) | 1 | 486,2397 * | 0,000150 ns | 78,2407 ns | 6.613,44 ns | 29.274,14 ns | 125,6446 ns | 0,2243 ns |
| Dietas (D) | 2 | 410,7624 * | 0,003941 ns | 89,5417 ns | 56.979,18 * | 167.056,30 ns | 58,6464 ns | 2,6381 ns |
| S x D | 2 | 29,6944 ns | 0,000089 ns | 58,2546 ns | 7.015,22 ns | 6.117,83 ns | 38,7604 ns | 4,6064 * |
| Resíduo-A | 12 | 89,8209 | 0,001337 | 94,7778 | 11.876,47 | 103.645,00 | 51,4151 | 0,9990 |
| Tempo (T) | 2 | 21.588,3700 ** | 0,051780 ** | 6,6806 ns | 28.831,09 ns | 400.977,80 ** | 1.445,8430 ** | 9,2490 ** |
| T x S | 2 | 161,1867 ns | 0,000406 ns | 12,5046 ns | 2.615,79 ns | 57.967,83 ns | 17,5271 ns | 4,1780 * |
| T x D | 4 | 638,0591 ** | 0,008932 ** | 43,1597 ns | 7.920,87 ns | 72.483,28 ns | 172,0244 * | 1,5435 ns |
| T x S x D | 4 | 51,0295 ns | 0,000653 ns | 92,9144 ns | 2.439,76 ns | 18.646,40 ns | 25,1450 ns | 1,1891 ns |
| Resíduo-B | 24 | 84,9461 | 0,000323 | 45,8750 | 12.603,40 | 68.400,71 | 49,8606 | 1,1483 |
| CV parcela (%) | | 18,09 | 32,00 | 55,45 | 73,70 | 192,51 | 34,65 | 13,66 |
| CV subparcela (%) | | 17,59 | 15,73 | 38,58 | 75,92 | 156,39 | 34,12 | 14,65 |

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 6 – Desdobramento de tempo dentro de dietas e de sexo, para o colesterol, triacilgliceróis, HDL, creatinina, glicose, proteína e albumina de coelhos avaliados aos 0, 15 e 30 dias

| FV | GL | Quadrado médio | | | | | | |
|--------------|----|----------------|------------------|-------------|---------------|---------------|------------|-------------|
| | | Colesterol | Triacilgliceróis | HDL | Glicose | Proteína | Albumina | Ácido úrico |
| T/ D1 machos | 2 | 6.293,82 ns | 13.055,19 ns | 1.824,59 ns | 1.122,2500 ns | 132,1944 ns | 7,3893 ** | 0,056433 ** |
| T/ D2 machos | 2 | 8.556,19 ns | 496.437,60 ** | 16.197,46 * | 2.590,2610 ** | 345,6036 ** | 23,9224 ** | 0,042033 * |
| T/ D3 machos | 2 | 39.681,79 ** | 20.442,34 ns | 2.206,19 ns | 1.573,4440 * | 485,4711 ** | 19,0251 ** | 0,056033 ** |
| T/ D1 fêmeas | 2 | 1.062,35 ns | 15.345,13 ns | 1.108,71 ns | 1.764,0000 * | 113,0341 ns | 8,0947 ** | 0,055300 ** |
| T/ D2 fêmeas | 2 | 7.298,55 ns | 17.732,37 ns | 1.981,13 ns | 654,8041 ns | 1.622,4430 ** | 31,9180 ** | 0,181078 ** |
| T/ D3 fêmeas | 2 | 4.164,44 ns | 21.618,31 ns | 8.107,97 ns | 2.110,9640 * | 581,9474 ** | 11,9025 ** | 0,024411 ns |
| Resíduo-B | 24 | 4.385,61 | 22.688,81 | 3.838,69 | 377,4837 | 44,7851 | 0,3393 | 0,009804 |

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

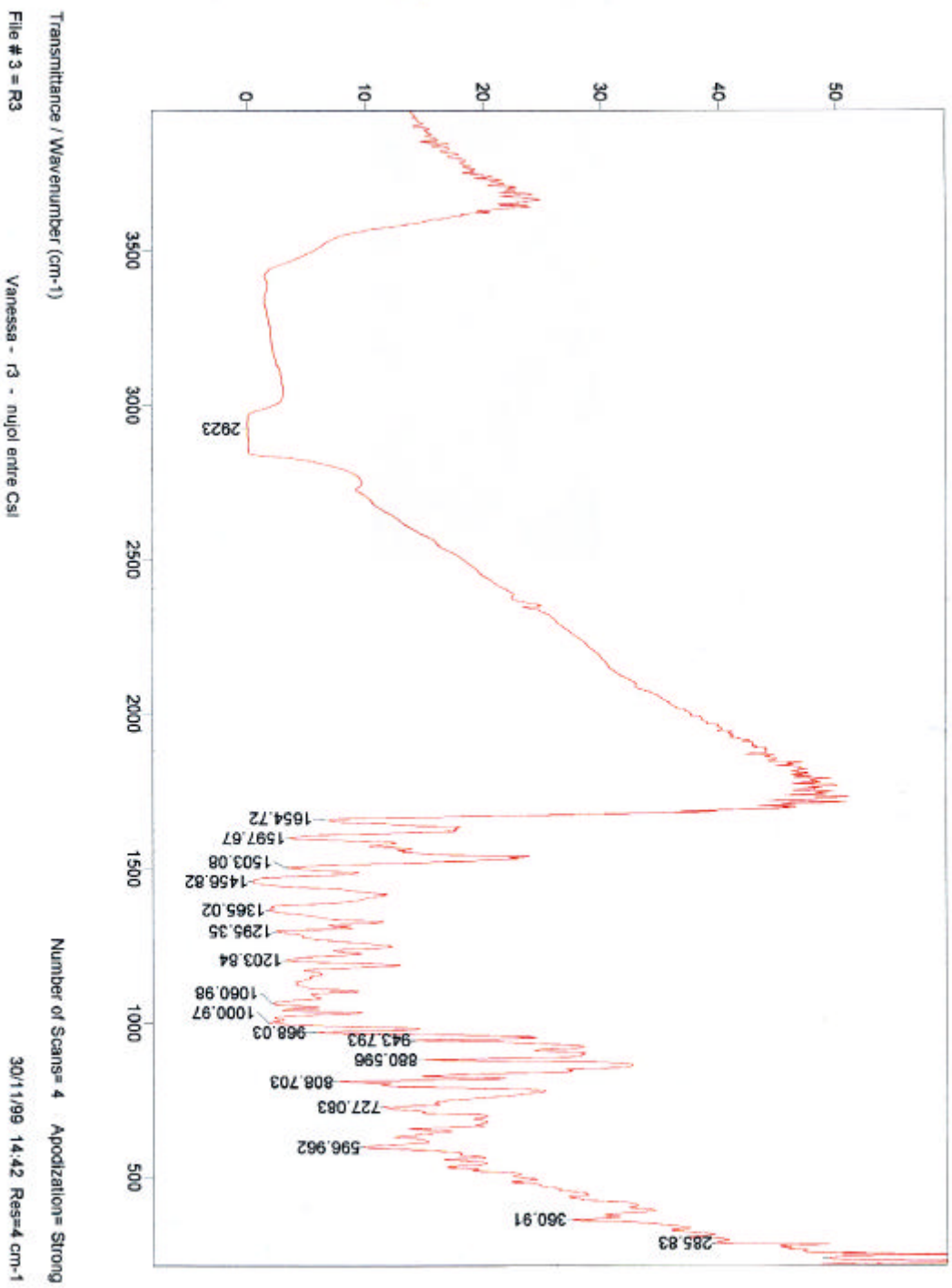
Quadro 7 – Desdobramento de tempo dentro de dietas e de sexo, para a uréia, bilirrubina total, gama-GT, TGP, TGO, cálcio e fósforo de coelhos avaliados aos 0, 15 e 30 dias

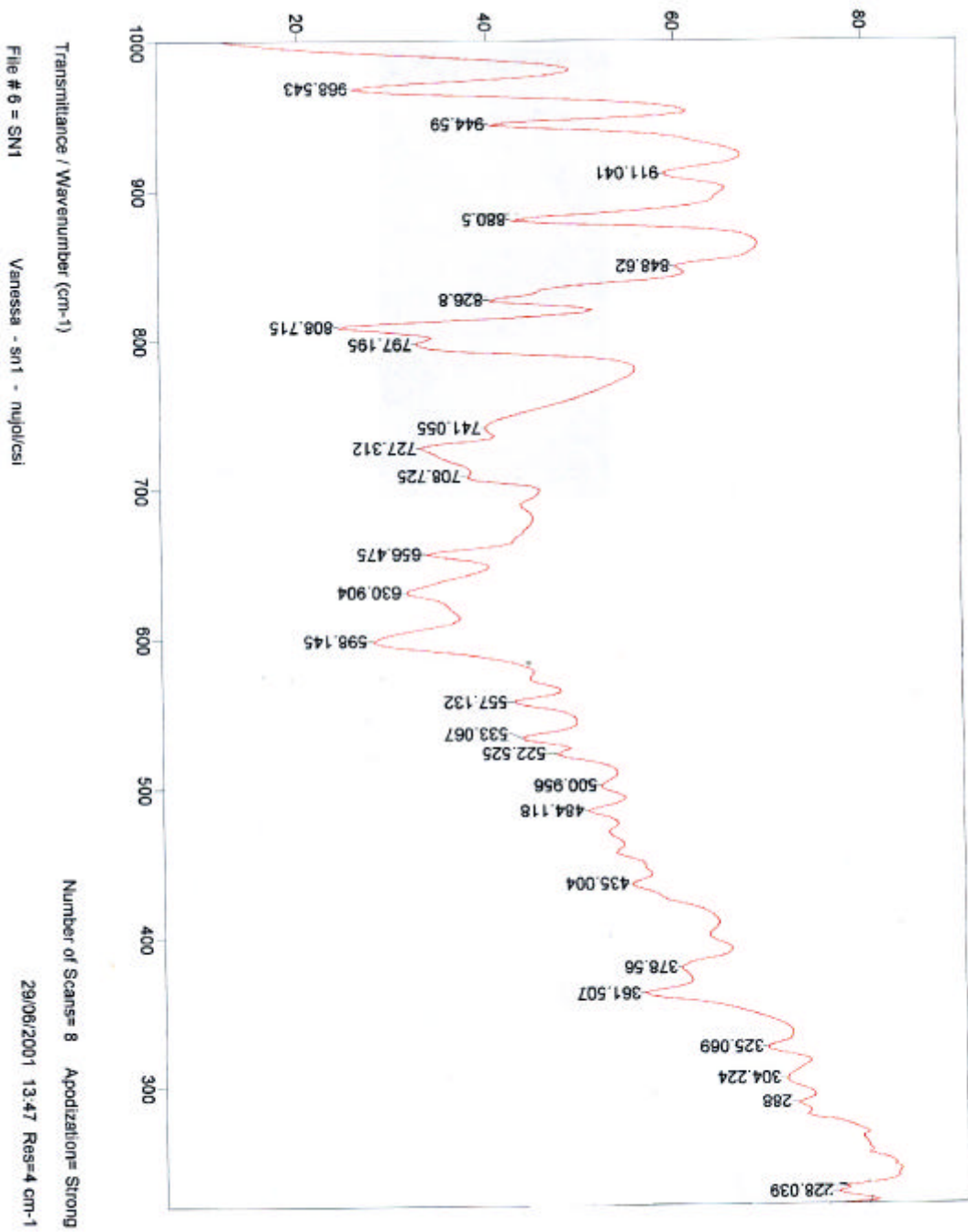
| FV | GL | Quadrado médio | | | | | | |
|--------------|----|----------------|-------------------|------------|----------------|---------------|-------------|-----------|
| | | Uréia | Bilirrubina total | Gama-GT | TGP | TGO | Cálcio | Fósforo |
| T/ D1 machos | 2 | 3.770,4010 ** | 0,011378 ** | 5,4445 ns | 7.033,0000 ns | 139.163,10 ns | 70,8964 ns | 2,7641 ns |
| T/ D2 machos | 2 | 1.670,2670 ** | 0,014411 ** | 68,2500 ns | 422,7512 ns | 9.930,35 ns | 649,7255 ** | 1,3954 ns |
| T/ D3 machos | 2 | 5.141,0800 ** | 0,017778 ** | 90,3333 ns | 16.454,3300 ns | 348.735,50 * | 260,2075 * | 4,7878 * |
| T/ D1 fêmeas | 2 | 3.127,3550 ** | 0,008711 ** | 36,0000 ns | 310,1111 ns | 5.273,44 ns | 169,8678 * | 1,6918 ns |
| T/ D2 fêmeas | 2 | 2.490,3680 ** | 0,012133 ** | 2,1111 ns | 3.228,6940 ns | 14.388,19 ns | 276,4078 * | 1,5870 ns |
| T/ D3 fêmeas | 2 | 6.928,2620 ** | 0,006944 ** | 89,1944 ns | 24.699,2500 ns | 123.714,10 ns | 430,6033 ** | 6,6662 ** |
| Resíduo-B | 24 | 84,9461 | 0,000323 | 45,8750 | 12.603,4000 | 68.400,71 | 49,8606 | 1,1483 |

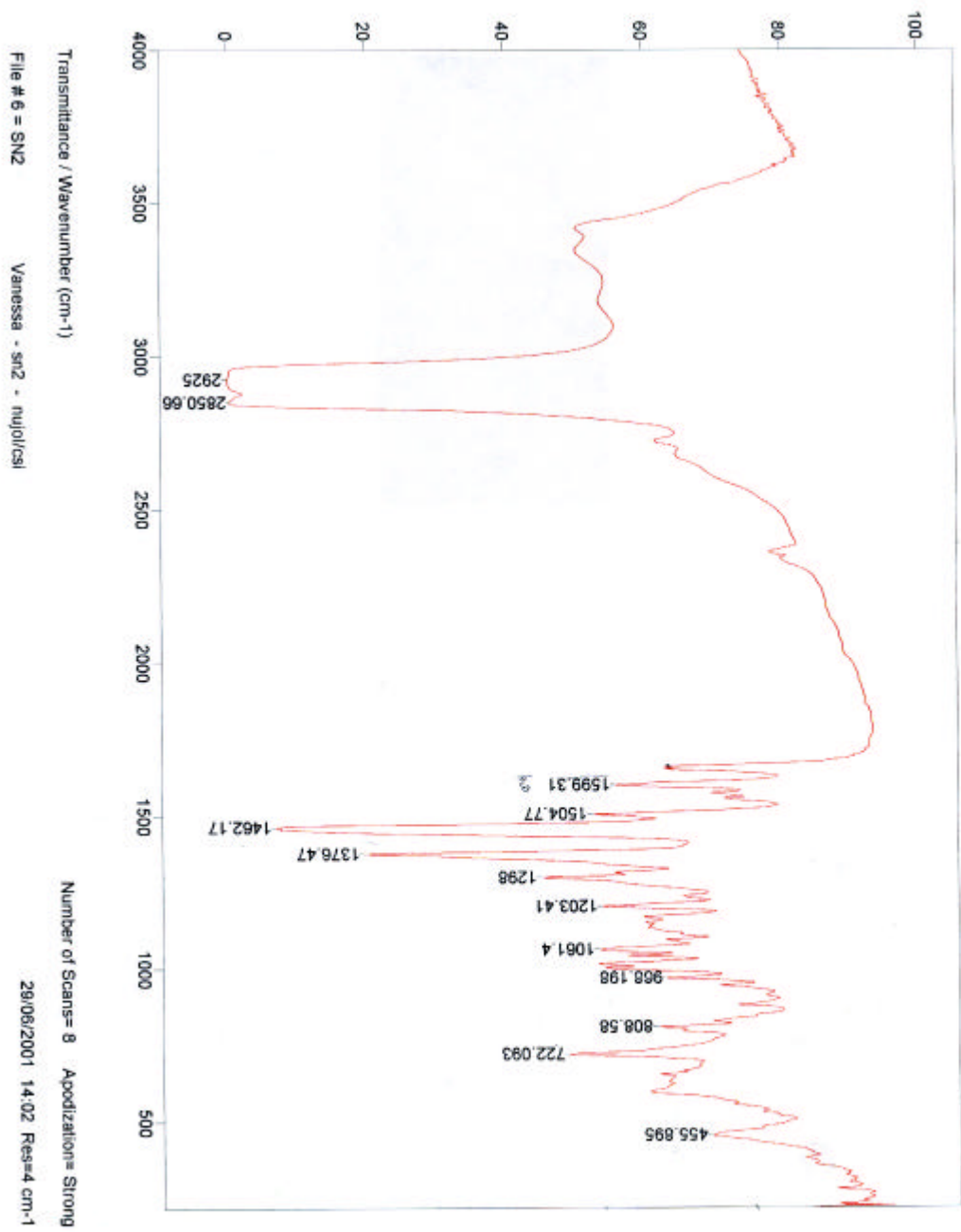
** F significativo a 1% de probabilidade.

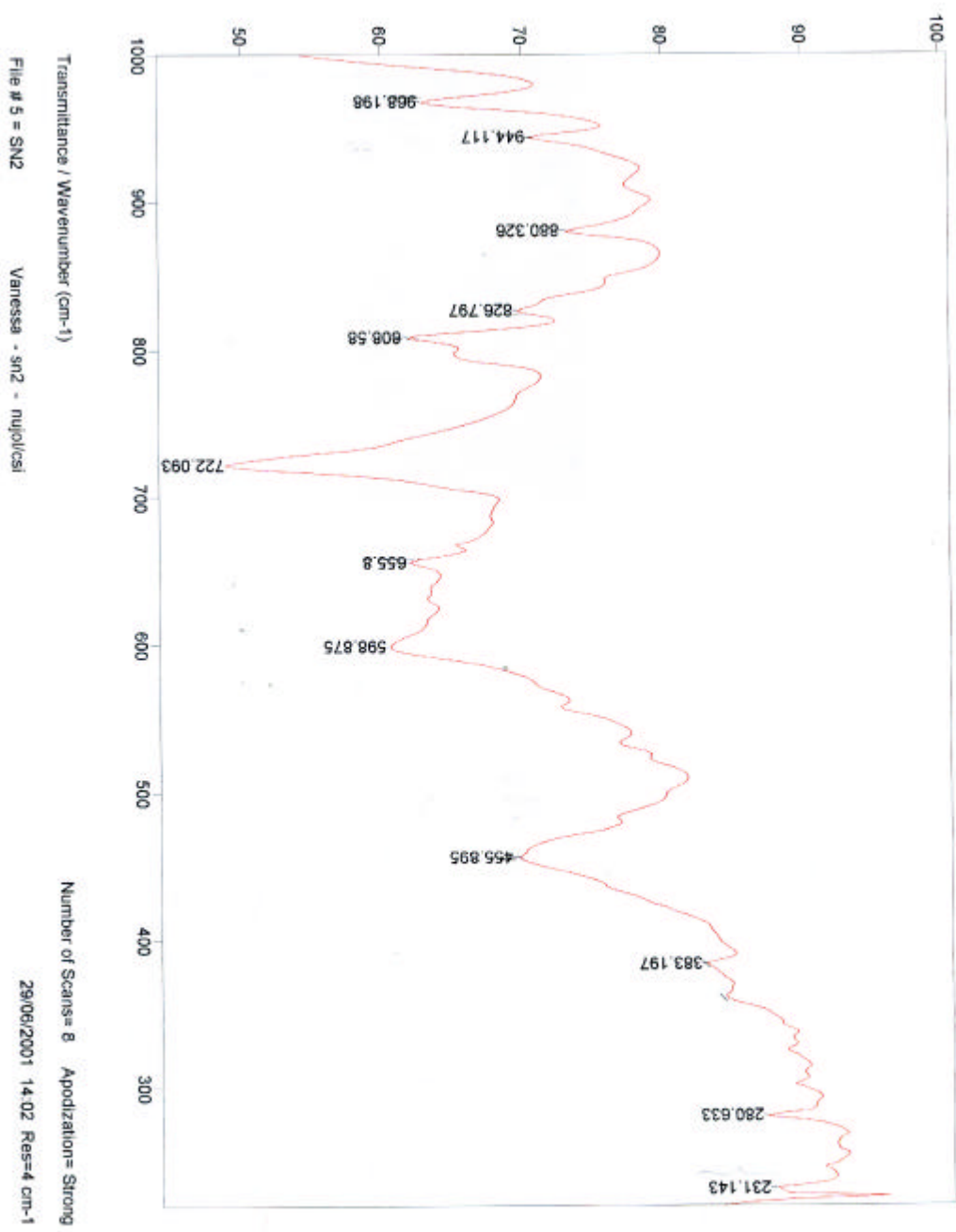
* F significativo a 5% de probabilidade.

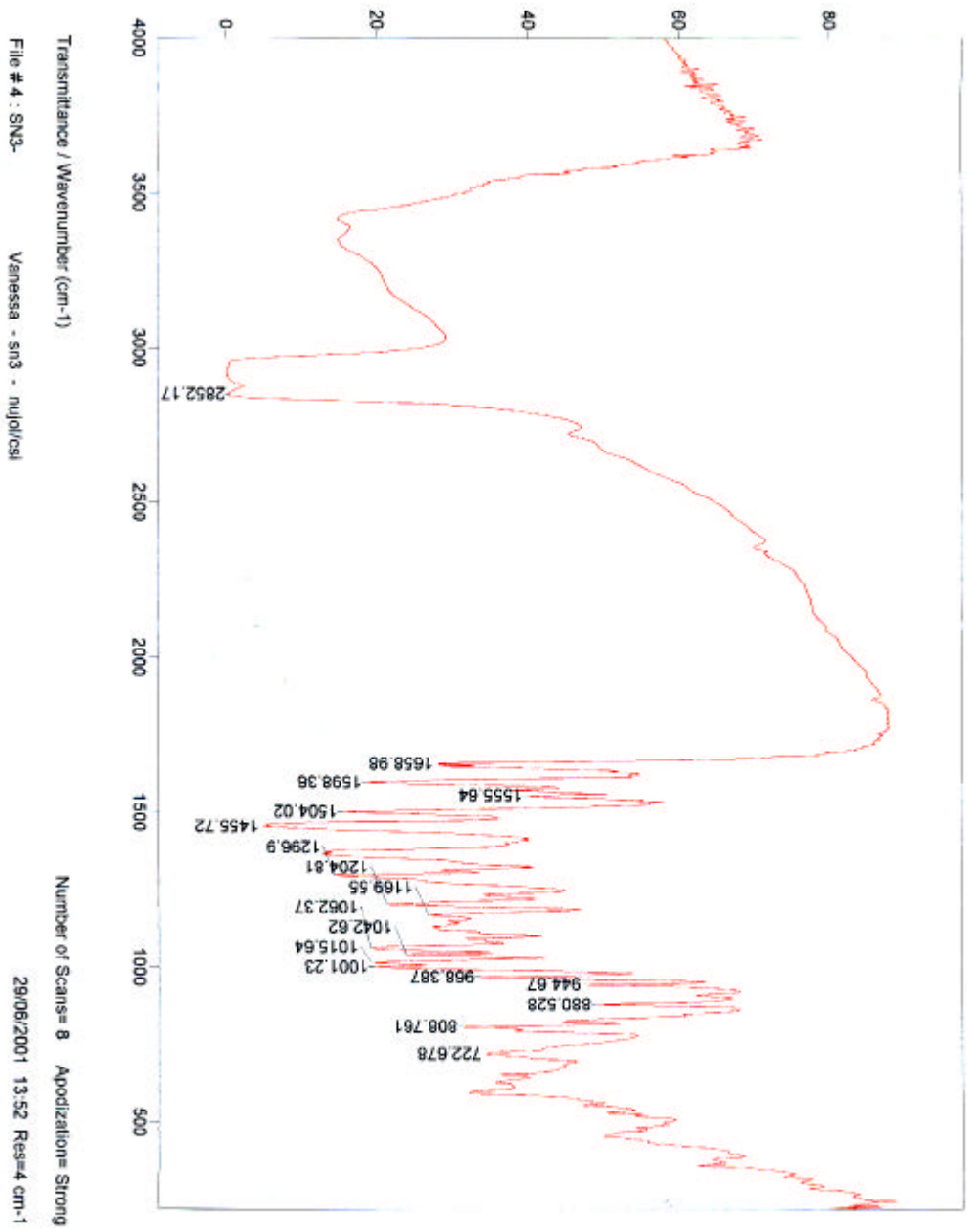
ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

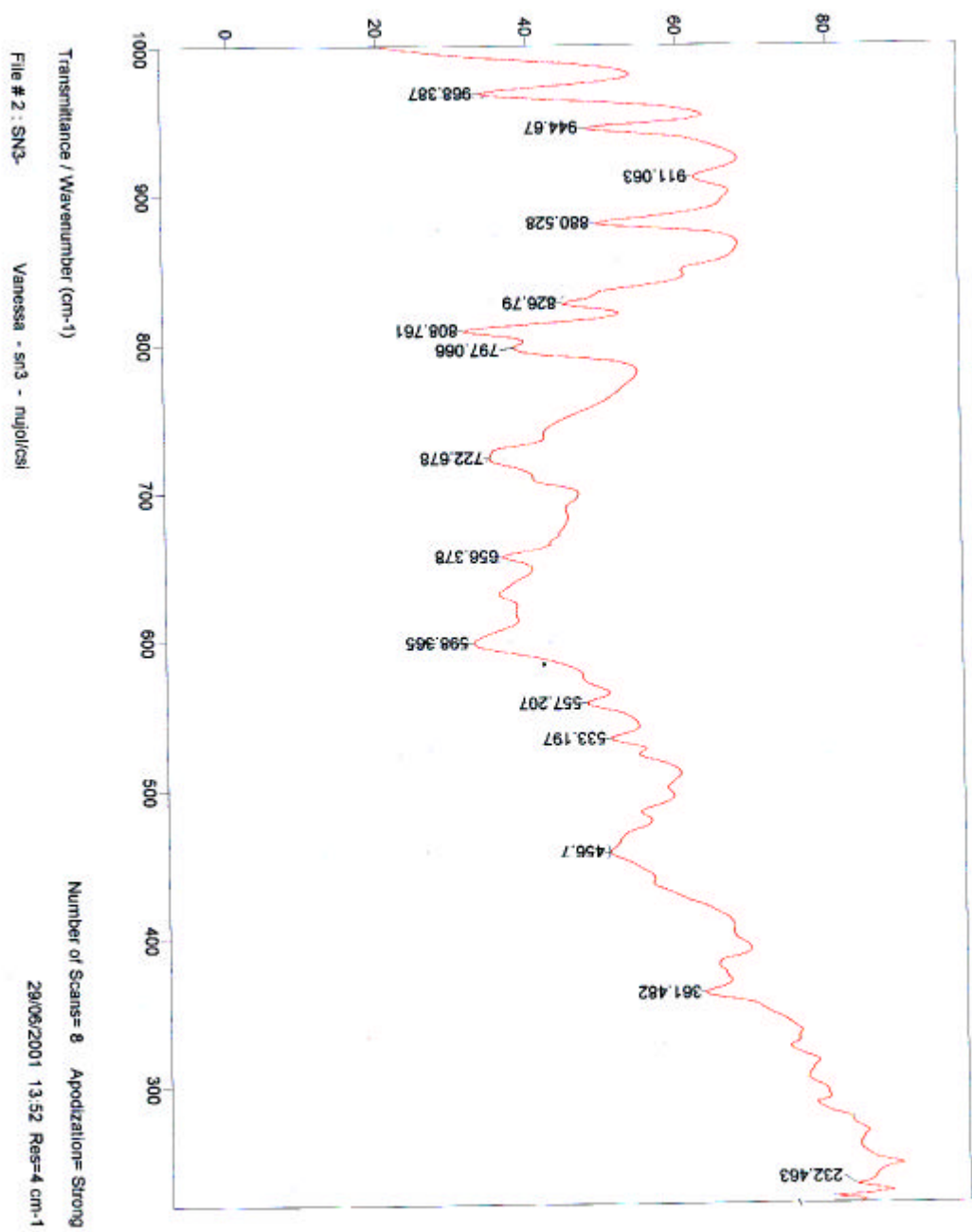


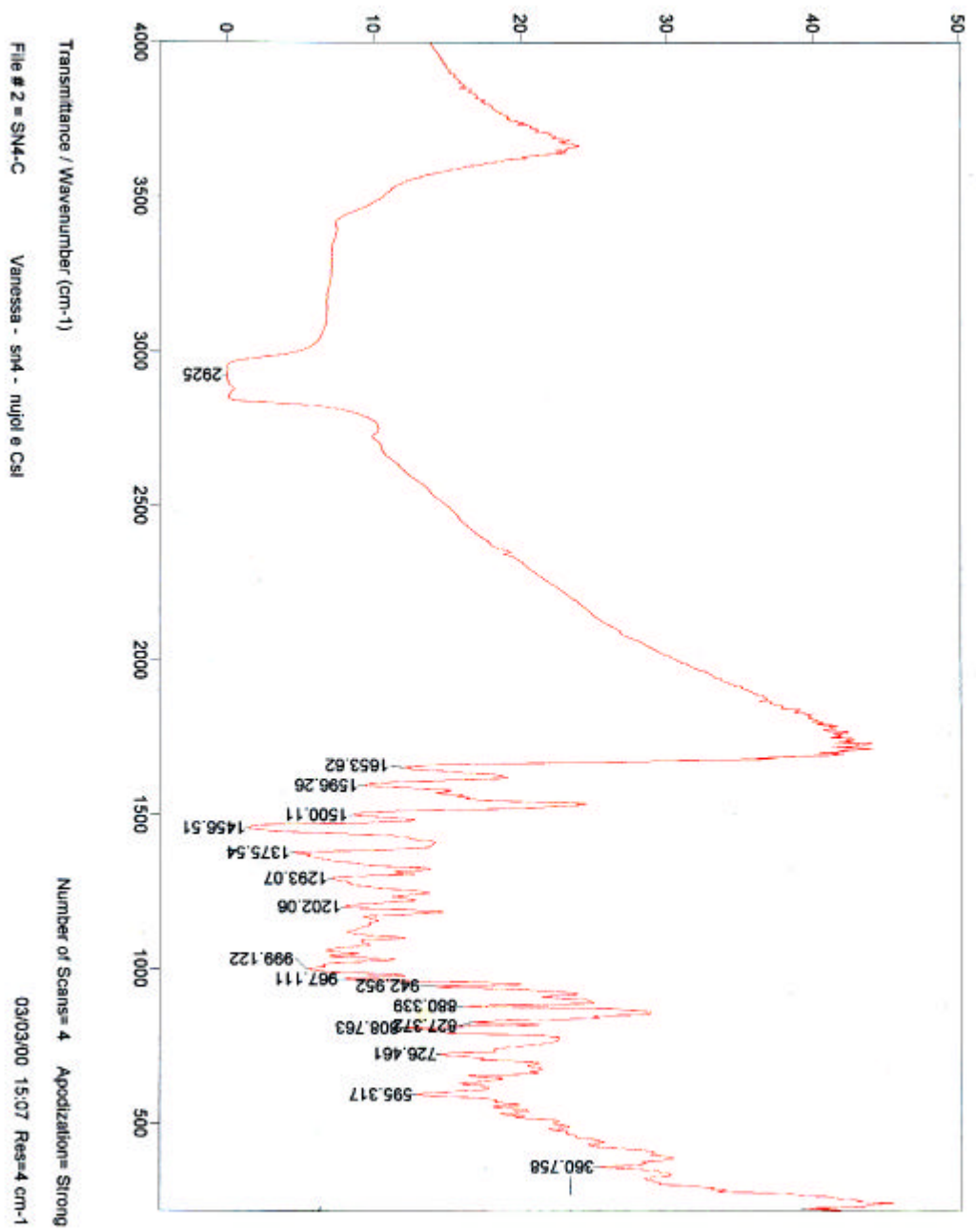


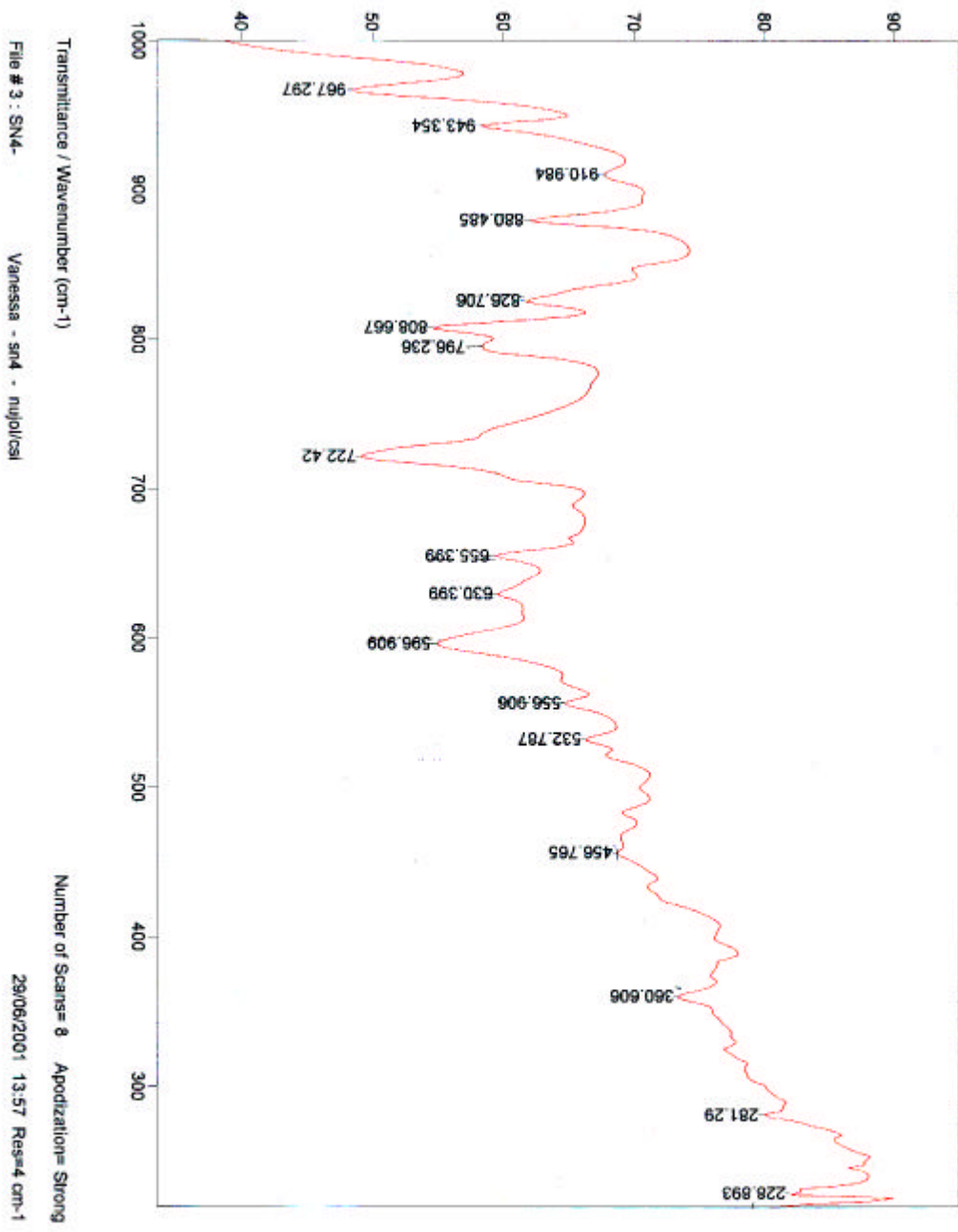


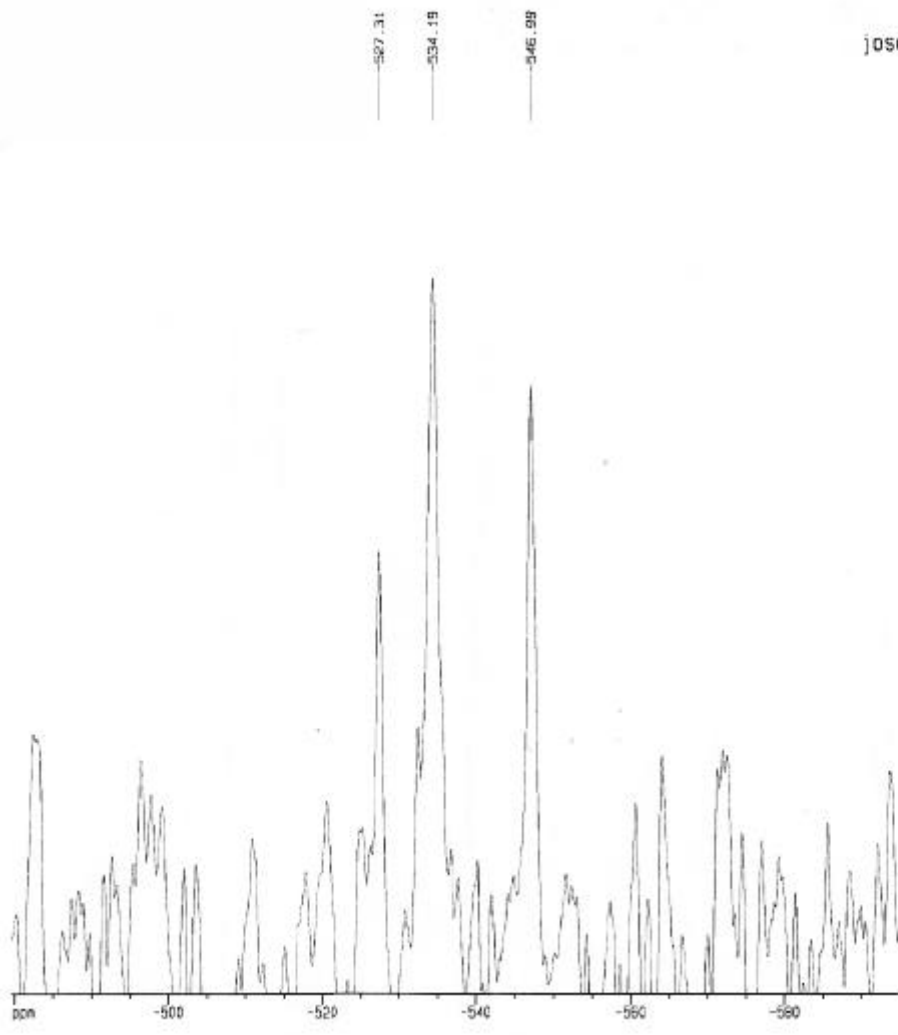












jose roberto/UFV - SN1
119Sn em MeOH

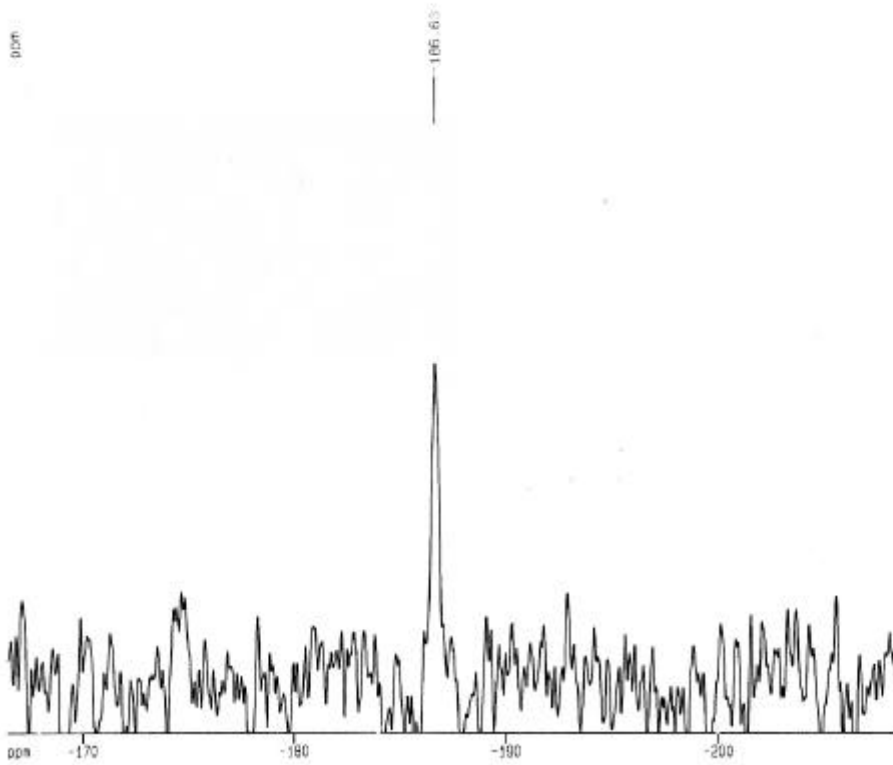
Current Data Parameters
NAME j0360s1
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 50000
Time 15.21
INSTRUM spect
PROBHD 10 mm Multinu
PULPROG zgpg
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 499
DS 2
SWH 37664.780 Hz
FIDRES 1.649436 Hz
AQ 0.4250452 sec
RG 9195.2
DK 13.278 usec
DE 6.50 usec
TE 300.0 K
d11 0.030000 sec
PL12 98.90 dB
D1 0.3000000 sec
P1 20.90 usec
DE 6.50 usec
SFO1 545.126374 MHz
NUC1 119Sn
PL1 3.90 dB
CPOPRG2 waltz16
PCPD2 100.80 usec
SFO2 400.1310000 MHz
NUC2 1H
PL2 3.90 dB

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 545.1310000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 100.80 Hz
GB 0
PC 1.40

1D NMR plot parameters
CX 20.90 cm
F1F -478.666 ppm
F1 -71579.32 Hz
F2F -994.637 ppm
F2 -89156.78 Hz
FREQH 5.75844 ppm/cm
HZCM 893.22615 Hz/cm

2) roberto/tannus - 2SR
 1195h en MeOH
 sinal pouco intenso e de difícil detecção
 [IMPUREZAS??]



Current Data Parameters
 NAME 119525h
 EXPNO 1
 PROCNO 1

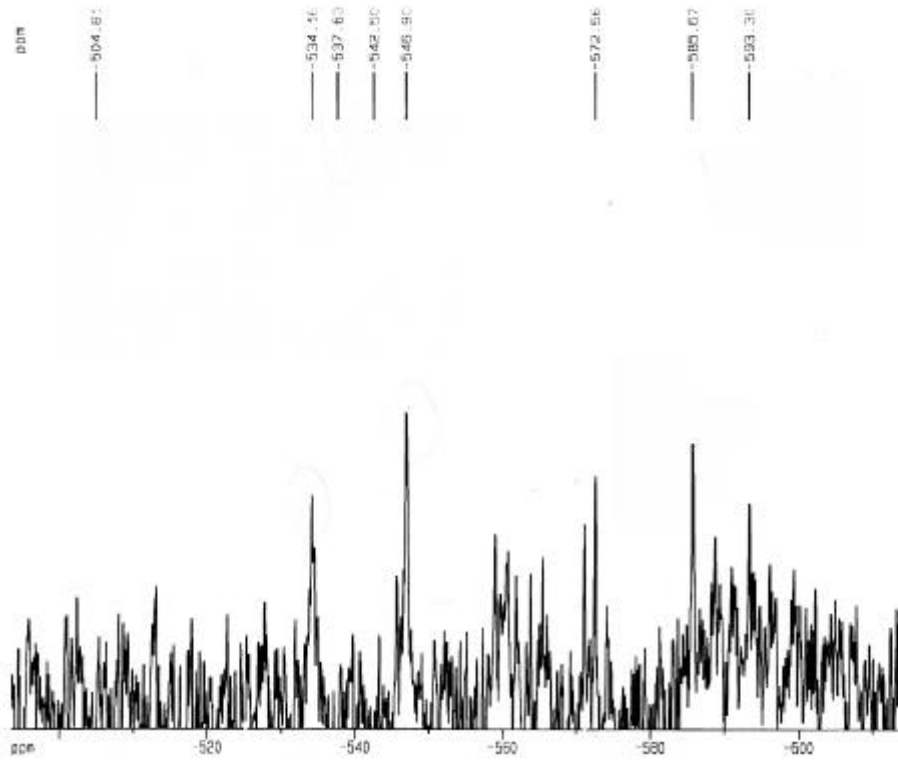
DATE_ 200902
 TIME 12.36
 INSTRUM spect
 PRGNAME zgpg30
 F2 100.621494
 F1 299.999999
 T0 30768
 SOLVENT DMS
 NS 11680
 DS 2
 SWH 129120.141 Hz
 FIDRES 4.170001 Hz
 AQ 1.1212012 sec

ZF 3.706 usec
 ZP 6.00 usec
 T 300.0 K
 L1 1.1000000 sec
 R12 15.00 sec
 D1 1.8000001 sec
 D4 23.00 usec
 DE 5.50 usec
 SFO1 149.999999 MHz
 NUC1 159P
 R1 3.00 sec
 CPROG2 waltz16
 RPR2 100.00 usec
 SFO2 400.1493000 MHz
 NUC2 1H
 R2 3.00 sec

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 100.6214940 MHz
 MDX DV
 SSB 0
 LB 20.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

F0 NMR list parameters
 CX 20.00 cm
 F1P -156.431 ppm
 F1 -299.999999 Hz
 F2P 299.945 ppm
 F2 -399.999999 Hz
 FREQ4 2.10773 ppm/cm
 H1N 314.94982 Hz/cm

ze roberto/tannus/UFV - 3SR
 119 Sn em MeOH
 amostra Ruim (NOITE de MAQUINA)



Current Data Parameters
 NAME 1166201
 DATE 1
 TIME 1

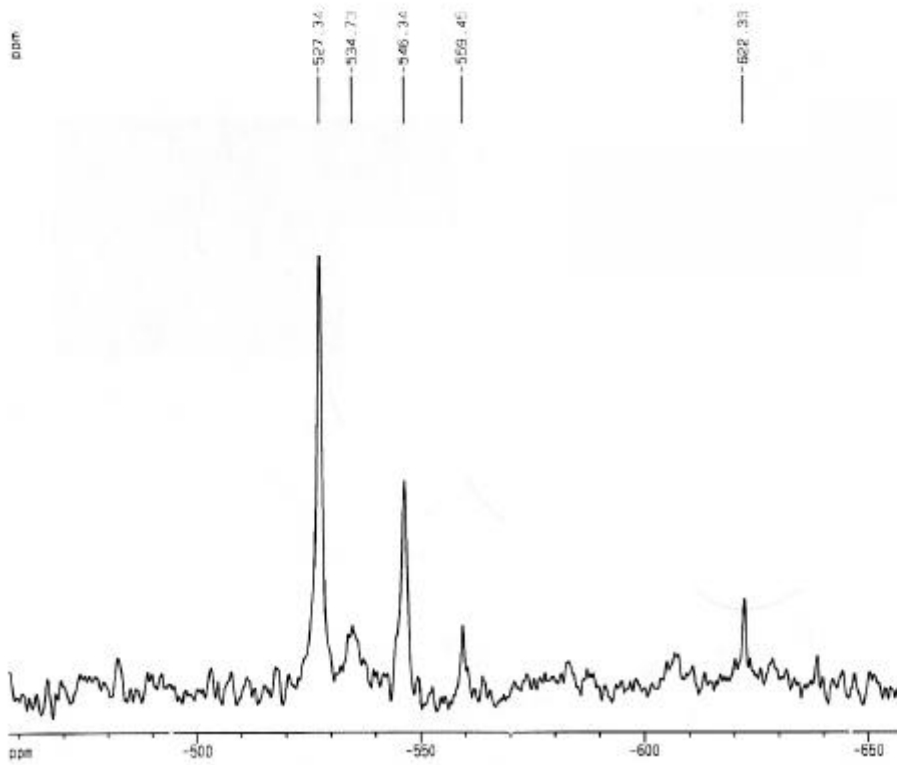
DATE 10/09/00
 TIME 21.52
 INSTRUM spect
 CHANNEL 10 cm N101 us
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT dms
 NS 10480
 DS 2
 SSB 0
 GB 0
 PC 0.100000 sec

DE 0.700 usec
 DF 0.50 usec
 EX 1.00 usec
 FL 0.000000 sec
 R12 15.00 dB
 CY 0.50000000 sec
 FX 00.00 usec
 GS 0.00 usec
 ST0 145.136475 MHz
 NU1 11000
 R1 0.00 dB
 CORPG2 waltz16
 ROTPR 100.00 usec
 ST2 400.1316000 MHz
 NU2 1
 R2 0.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 145.211000 MHz
 AQ 0
 SFO 0
 LB 20.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

F1 - F2 list parameters
 CF 20.00 usec
 FCF 400.400 usec
 F1 -73025.00 Hz
 F2F -514.484 usec
 F2 -51988.00 Hz
 FWHM 0.04500 usec/cycle
 HZM 992.00000 Hz/cycle

ze roberto/tannus/UFV - 4sr
 (Sn em MeOH)



Current Data Parameters
 NAME: 1130461
 EXPNO: 1
 PROCNO: 1

Date_: 100000
 Time: 14.20
 INSTRUM: spect
 F2FREQ: 100.621 MHz
 F1FREQ: 299.9
 F0: 30788
 SOLVENT: D2O
 NS: 1614
 DS: 2
 SWH: 74926.867 Hz
 FIDRES: 0.27240 Hz
 AQ: 0.218668 sec

GB: 8.700 usec
 DE: 6.50 usec
 TE: 300.2 K
 D11: 0.0000000 sec
 RL12: 15.00 dB
 D1: 0.0000000 sec
 RL: 23.00 dBec
 DE: 6.00 usec
 SFO1: 146.1428330 MHz
 NU1: 1024
 RL1: 2.00 dB
 CHRG12: 44112.0
 RPD12: 100.00 usec
 SFO2: 400.1316025 MHz
 VAC2: 2+
 RL2: 3.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI: 30788
 SF: 146.2118601 MHz
 CH: EM
 SSB: 0
 LB: 500.00 Hz
 GB: 0
 PC: 1.40

F1 NMR list parameters
 CH: 20.00 cm
 F1P: -457.740 ppm
 F1: -68300.26 Hz
 F2P: -857.756 ppm
 F2: -68351.00 Hz
 PWDW: 10.0000 ppm/cm
 HDW: 1460.53223 Hz/cm