

LEONARDO RAMOS PAES DE LIMA

**EFEITOS FARMACOLÓGICO, TOXICOLÓGICO E MECANISMO DE AÇÃO  
DOS FLAVONÓIDES E CORANTES NATURAIS EXTRAÍDOS DO URUCUM  
(*Bixa orellana L.*) NO METABOLISMO LIPÍDICO DE COELHOS**

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  
JANEIRO - 2001**

LEONARDO RAMOS PAES DE LIMA

**EFEITOS FARMACOLÓGICO, TOXICOLÓGICO E MECANISMO DE AÇÃO  
DOS FLAVONÓIDES E CORANTES NATURAIS EXTRAÍDOS DO URUCUM  
(*Bixa orellana L.*) NO METABOLISMO LIPÍDICO DE COELHOS**

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: 19 de abril de 2000.

Tanus Jorge Nagem  
(Conselheiro)

Maria Goreti de Almeida Oliveira  
(Conselheiro)

Adelson Luiz Araujo Tinoco

Marli Lourdes de Oliveira

Tânia Toledo de Oliveira  
(Orientadora)

Dedico esta tese a minha esposa Marília e aos meus filhos Rafael, Marina e Bruno, pelo apoio, incentivo e dedicação por mais esta etapa cumprida.

## **AGRADECIMENTO**

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

Aos meus pais (in memoriam), pelo exemplo de vida, pela educação e ensinamentos, dos quais foram essenciais para a minha formação.

À minha esposa e aos meus filhos, pelo amor, carinho, pela dedicação e força no meu dia a dia.

À professora Tânia Toledo de Oliveira, pela orientação, dedicação, compreensão, amizade e ensinamentos oferecidos durante a minha formação.

Ao professor Tanus Jorge Nagem, pelos seus aconselhamentos, suas experiências de vida, pela amizade e compreensão.

Ao professor Aloísio da Silva Pinto, pela grande atenção dispensada, pela amizade, pelo companheirismo e ensinamentos a mim conferidos.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pelos seus aconselhamentos e sua boa vontade de auxílio no que foi preciso.

À professora Maria Eliana Lopes de Queiroz, pela amizade, atenção, pelo carinho e ensinamentos.

À Maria Aparecida Leão, pela ajuda e amizade oferecidas durante toda a realização deste trabalho.

À Solange Starling Brandão e ao Eduardo Monteiro, pela atenção oferecida.

Aos colegas do laboratório, Kelly, Wander, Renato, Rosimar, Selma, Marley, Nino, Marco Antônio, Alexandre, Ana Paula, Graciele, Fabiana, Cleysson, Patrícia, Martina, Holdai, Emerson e demais estudantes do laboratório de biofármacos, pela valorosa ajuda e dedicação, pelo companheirismo, pela amizade e incentivos em nossos constantes convívios.

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

Ao José Geraldo Pinto, pelo apoio indispensável.

A Silvana, pelas análises estatísticas e apoio prestado.

Aos professores Adelson Luiz Araujo Tinoco e Marli Lourdes de Oliveira, pela ajuda na reformulação e pelas críticas que muito contribuíram para a melhoria desta tese.

Aos meus amigos Vitor Hugo Rodrigues dos Santos, Rodrigo Lassarote Lavall e Marcelo Mendes de Carvalho, pela amizade e companheirismo nas horas boas e ruins desta jornada.

Aos meus tios Arisitides e Maria Helena, pela força, dedicação e ajuda indispensável durante esta fase de minha vida.

Aos meus irmão por tudo o que vivemos até aqui e iremos viver.

Ao Sr. João, Sra. Marlene e aos meus cunhados, pela ajuda e amizade.

Aos coelhos que foram sacrificados durante a realização deste trabalho.

À FAPEMIG, pelo financiamento do projeto e pela bolsa de estudo.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram na conquista de mais essa etapa de minha vida.

## **BIOGRAFIA**

Leonardo Ramos Paes de Lima nasceu na cidade de Coronel Fabriciano, MG, em 15 de julho de 1972, filho de Walter José Paes de Lima e Vera Luce Ramos Lima.

Cursou o primeiro grau no Colégio São Francisco Xavier, em Ipatinga, MG.

No ano de 1991, concluiu o curso Técnico em Química, no Colégio Padre De Man, em Coronel Fabriciano, MG, e em 1997, concluiu o curso de bacharelado e licenciatura em Química, na Universidade Federal de Viçosa, MG.

Em março de 1998, iniciou seus estudos no Programs de Pós-graduação em Agroquímica na Universidade Federal de Viçosa, MG, defendendo sua tese em abril de 2000.

## CONTEÚDO

<b>EXTRATO .....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XI</b>
<b>1 . INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 . REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 . Hipercolesterolemia e metabolismo lipídico em coelhos .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 . Flavonóides e suas características químicas .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.1 . Propriedades biológicas .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3 . Corantes naturais.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.1 . Propriedades biológicas de carotenóides .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.2 . Extrato do urucum .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.3 . Aplicações do corante do urucum .....</b>	<b>29</b>
<b>2.4 . Constituintes sangüíneos .....</b>	<b>30</b>
<b>2.4.1 . Uréia.....</b>	<b>30</b>
<b>2.4.2 . Creatinina.....</b>	<b>33</b>
<b>2.4.3 . Ácido Úrico.....</b>	<b>37</b>
<b>2.4.4 . Colesterol.....</b>	<b>41</b>

2.4.5 . Colesterol-HDL .....	44
2.4.6 . Triacilgliceróis.....	46
2.4.7 . Transaminases .....	46
2.4.8 . Cálcio .....	49
<b>3 . MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
3.1 . Extração e determinação dos constituintes químicos do urucum	51
3.2 . Primeiro ensaio biológico de curta duração (44 horas de duração)	52
3.2.1 . Determinação do colesterol .....	53
3.2.2 . Determinação do triacilglicerol.....	54
3.2.3 . Determinação do colesterol-HDL.....	55
3.3 . Segundo ensaio biológico com duração de 28 dias .....	55
3.4 . Testes de toxicidade aguda .....	56
3.4.1 . Determinação da creatinina .....	56
3.4.2 . Determinação de proteínas totais.....	57
3.4.3 . Determinação do cálcio.....	59
3.4.4 . Determinação da uréia.....	59
3.4.5 . Determinação do ácido úrico.....	60
3.4.6 . Determinação da transaminase glutâmico pirúvico (TGP).....	61
3.4.7 . Determinação da transaminase glutâmico oxalacético (TGO)	62
3.5 . Efeito de modificadores químicos sobre a atividade de lipase ....	63
3.6 . Testes estatísticos .....	65
<b>4 . RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
4.1 . Extração e determinação dos constituintes químicos do urucum	66
4.1.1 . Espectrometria dos constituintes do urucum .....	67
4.2 . Primeiro ensaio biológico de curta duração (44 horas de duração)	69

4.3 . Segundo ensaio biológico com duração de 28 dias .....	75
4.4 . Testes de toxicidade aguda .....	83
4.5 . Efeito de modificadores químicos sobre a atividade de lipase ....	94
5 . RESUMO E CONCLUSÕES .....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	103
APÊNDICE .....	116

## EXTRATO

LIMA, Leonardo Ramos Paes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2001. **Efeitos farmacológico, toxicológico e mecanismo de ação dos flavonóides e corantes naturais extraídos do urucum (*Bixa orellana L.*) no metabolismo lipídico de coelhos.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Conselheiros: Tanus Jorge Nagem e Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Realizaram-se 2 ensaios biológicos para avaliar a ação farmacológica de flavonóides e corantes naturais, extraídos do urucum (*Bixa orellana L.*). Inicialmente, avaliaram-se algumas características químicas de sementes dos híbridos, fruto verde piloso e fruto vermelho, por análises químicas. Foram determinados os teores de proteínas, carboidratos, ácidos digeríveis e gorduras. A bixina foi identificada e quantificada e os flavonóides luteolina e apigenina glicosidados foram identificados por UV, IV, RMN e cromatografia. Em posse dos resultados, montou-se o primeiro ensaio biológico, utilizando-se os flavonóides luteolina e apigenina e o corante bixina a 30 e 95% de pureza. Testaram-se estas substâncias no metabolismo lipídico de coelhos da raça Nova Zelândia, com hiperlipidemia induzida por Triton, que receberam as substâncias em estudo na dose de 0,01mol/kg de peso corporal, por via intraperitoneal, utilizando o propilenoglicol como veículo. Vinte e quatro horas após a aplicação destas substâncias, o sangue foi coletado e analisaram-se os teores de colesterol, colesterol-HDL e triacilgliceróis no soros. Todas as substâncias testadas foram eficazes na redução do colesterol total, sendo a mais eficiente a

bixina a 30%. Em relação ao colesterol-HDL, a apigenina foi a substância que mais elevou os seus níveis. Quanto à redução dos triacilgliceróis, o melhor resultado foi obtido com a bixina a 30%, sendo esta a única substância a reduzir os níveis de triacilglicerol. No segundo ensaio biológico foram testadas as substâncias quercetina, rutina, bixina a 95% e norbixina, sendo testadas separadamente e em associações. A hiperlipidemia foi induzida administrando ácido cólico e colesterol na ração diária dos animais. As substâncias foram fornecidas na dose de 0,01 mol/Kg de peso corporal, por via oral, em cápsula, utilizando o talco como veículo. Após 28 dias com o tratamento, foram dosados o colesterol, colesterol-HDL, triacilgliceróis, creatinina, proteínas totais, cálcio, uréia, ácido úrico e as enzimas transaminase glutâmico pirúvico e transaminase glutâmico oxalacético. Todos os tratamentos reduziram o nível de colesterol, sendo que o melhor resultado foi obtido com a bixina. A quercetina foi a que melhor baixou os níveis de triacilgliceróis. O melhor aumento dos níveis de colesterol-HDL foi conseguido com a rutina. O resultado conseguido com os outros constituintes foram analisados para se obter a toxicidade aguda destas substâncias nos organismos dos animais. Em termos gerais, não se observou nenhum efeito tóxico destas substâncias. Em outro experimento, procurou-se caracterizar o efeito das substâncias estudadas sobre a atividade da lipase, variando-se a concentração dos modificadores, sendo que todos eles aumentaram esta atividade. Concluiu-se que as substâncias extraídas do urucum foram eficientes no controle do metabolismo lipídico e que na dose aplicada não apresentaram nenhum teor de toxicidade aguda, sendo que um dos mecanismos para explicar os níveis reduzidos de triacilgliceróis é o aumento da atividade da lipase por essas substâncias.

## ABSTRACT

LIMA, Leonardo Ramos Paes, M. S., Universidade federal de Viçosa, january of 2001. **Pharmacological and toxicological effects and the mechanism of action of flavonoids and natural coloring extracted from urucum (*Bixa orellana L.*) in the lipidic metabolism of rabbits.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Committee members: Tanus Jorge Nagem and Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Two biological assays were realized to evaluate the pharmacological action of flavonoids and natural coloring, extracted of the urucum. Initially, it was evaluated some chemical characteristics of seeds of the hybrids, green hairy fruit and red fruit, by chemical analyses. The bixin was identified and quantified and the flavonoids luteolin and apigenin glicosil were identified for UV, IV, RMN and chromatography. In ownership of the results, the first biological assay was set up, being used the flavonoids luteolin and apigenin and the coloring bixin at 30% and 95% of purity. These substances were tested in the lipidic metabolism of rabbits of the race New Zealand, with hyperglycemia induced by triton and receiving the substances in study in the dose of 0,01 mol/Kg of corporal weight, by intraperitoneal route, using the propilenoglicol as vehicle. 24 hours after the application of those substances, the blood was collected and the levels of cholesterol, cholesterol-HDL and triacylglycerols in the serum were analyzed. All the tested substances were effective in the reduction of the total cholesterol, being the bixin at 30% the most efficient. The apigenin was the substance that

more elevated the levels of cholesterol-HDL. Considering the reduction of triacylglycerols, the best result was obtained with the bixin at 30%, being that the only substance to reduce the triacylglycerols levels. In the second biologic assay the substances quercetin, rutin, bixin at 95% and norbixin were tested separately and in associations. The hyperlipidemia was induced administering colic acid and cholesterol in the daily ration of the animals. The substances were supplied in the dose of 0,01 mol/Kg of corporal weight, orally, in capsule, using the talc as vehicle. After 28 days of treatment, the cholesterol, cholesterol-HDL, triacylglycerols, creatinine, total proteins, calcium, urea, acid uric and the enzymes glutamate pyruvate transaminase and glutamate oxalacetic transaminase were dosed. All the treatments reduced the cholesterol level, and the best result was obtained with the bixin. The quercetin was the one that best reduced the triacylglycerols levels and the best increase of the levels of cholesterol-HDL was gotten with rutin. The results obtained with the other constituents were analyzed to know the sharp toxicity of these substances in the organism of the animals. In general terms, it was not observed any toxicant effect of these substances. In another experiment it was tried to characterize the effect of concentration of the modifiers. All of them increased that activity. It is possible to conclude that the extracted substances of the aurum were efficient in the control of the lipid metabolism and in the applied dose they didn't present any intensity of sharp toxicity, being the increase of the activity of lipase by those substances one of the mechanisms to explain the reduced levels of triacylglycerols.

## 1 . INTRODUÇÃO

Uma das grandes preocupações que afetam hoje a humanidade está relacionada aos lipídeos, presentes na corrente sanguínea, que podem provocar distúrbios cardiocirculatórios do tipo infarto do miocárdio e derrame cerebral, com conseqüências graves. O teor elevado de colesterol no organismo é causado, principalmente, por maus hábitos alimentares adquiridos e ou de ordem genética (hipercolesterolemia familiar) (MARTINEZ e LOURENÇO, 1996).

No Brasil, a prevalência de doenças crônico-degenerativo têm aumentado muito, sendo 40% de obesos, 15% dislipidêmicos, 29% doentes coronarianos e 16% de diabéticos, sendo que a tendência é aumentar nos próximos anos.

O condicionamento destes índices está relacionado ao estilo de vida, aos maus hábitos alimentares, a pouca disponibilidade ou quase nenhum conhecimento da ciência e da população.

Os flavonóides são classes de compostos fenólicos que possuem em sua estrutura anéis aromáticos, constituindo unidades de um esqueleto de carbono  $C_6-C_3-C_6$ .

Os compostos flavonoídicos têm sido estudados por possuírem propriedades de diminuir a síntese do colesterol *in vivo*. O efeito hipocolesterolêmico das leguminosas tem sido atribuído à presença dos flavonóides Quercetina, Marsupina, Pterosupina, Liquiritigenina, Luteolina, que

são micromoléculas naturais isoladas de diversas fontes vegetais. Flavonóides extraídos de soja e seus derivados têm sido também testados, observando-se o mesmo efeito hipocolesterolêmico (NAGEM et al., 1994).

Estudos mostram que estes flavonóides, provavelmente, atuam sobre as lipases, uma vez que estas enzimas estão relacionadas com o metabolismo de triacilgliceróis. Elas têm um papel fundamental, tanto na absorção de lipídeos no intestino (lipase pancreática) e dos lipídeos da lipoproteína do sangue (lipase lipoprotéica), quanto na degradação destes no organismo (lipases das células hepáticas) (LIMA et al., 1999).

Ações de compostos flavonoídicos sobre diversas enzimas têm sido comprovada por diversos pesquisadores. Os efeitos inibitórios sobre a atividade enzimática são conhecidos para aldose redutase (CHAUDHRY et al., 1983), fosfodiesterase (BERETZ et al., 1986),  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase (AUF'MKOLK et al., 1981), lipoxigenase (HOPE et al., 1983), ciclooxigenase (RATTY e DAS, 1988) e xantina oxidase (MOULIN et al., 1994).

Com o objetivo de se obter uma redução no nível de lipídeos na corrente circulatória de coelhos e também estudar a sua toxicidade, o presente trabalho foi desenvolvido, utilizando corantes naturais **Bixina e Norbixina**, principais extratos do Urucum e os flavonóides **Rutina, Quercetina, Apigenina e Luteolina**, também encontrados no Urucum.

Estas substâncias foram administradas isoladamente e associadas umas com as outras, em coelhos, fazendo-se um estudo do efeito delas sobre o metabolismo lipídico, verificando seus efeitos farmacológicos e toxicológicos.

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

A toxicidade cumulativa é o efeito nefasto de doses repetidas, resultante 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.

Para que se fizesse uma avaliação do efeito destas substâncias no organismo do coelho, foram dosados, além do colesterol, triacilglicerol e colesterol-HDL, também a uréia, creatinina, proteínas, cálcio e as enzimas

transaminase glutâmico pirúvico (TGP) e transaminase glutâmico oxalacético (TGO).

Estes constituintes revelam se o organismo do animal está sofrendo algum tipo de distúrbio ao serem ingeridas as substâncias testes.

A TGO e TGP, por exemplo, fazem parte das chamadas “enzimas indicadoras”. A TGP encontra-se na fração solúvel da célula e a TGO na fração solúvel e nas mitocôndrias. Suas atividades no soro estão relacionadas com a integridade da célula hepática. A atividade elevada destas enzimas indicam que o fígado está com algum tipo de enfermidade hepática primária ou secundária.

Foi realizado, ainda, um estudo sobre a influência destas substâncias sobre a atividade da lipase in vitro, enzima que hidroliza os triacilgliceróis, objetivando esclarecer um dos possíveis mecanismos de ação destes compostos sobre o metabolismo lipídico.

## **2 . REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 . Hipercolesterolemia e metabolismo lipídico em coelhos**

A digestão de ácidos graxos em mamíferos ocorrem no intestino delgado. Supõe-se que, no processo de digestão, há liberação dos ácidos graxos das moléculas de triacilgliceróis, que são hidrolisadas pela lipase secretada pelo pâncreas. Como os ácidos graxos não são hidrossolúveis, eles são emulsionados no trato digestivo pelos sais biliares contidos na bile, que é produzida no fígado e secretada ao duodeno através do ducto biliar. Os ácidos graxos, sais biliares e outros produtos lipossolúveis se agrupam em miscelas que são transportados através das membranas das vilosidades, onde são absorvidos (CHEEKE, 1995).

Dispõem-se de escassa informação sobre os pontos específicos da digestão dos lipídeos no coelho, mas, provavelmente, tem lugar fundamental no intestino delgado, onde se agregam a lipase e a bile (CHEEKE, 1995). Os ácidos graxos insaturados consumidos pelos ruminantes se hidrogenam no rúmen, convertendo-se em ácidos graxos saturados, que determinam o alto conteúdo destes ácidos na carne dos ruminantes. 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 das gorduras insaturadas no coelho.

Os ácidos linoléico, linolênico e araquidônico se chamam ácidos graxos essenciais, já que sua falta determina a apresentação de sintomas de deficiências, como dermatite e crescimento lento de coelhos. Os ácidos graxos essenciais funcionam como componentes das membranas celulares e como precursores do hormônio prostaglandina. A partir do ácido linoléico, pode sintetizar os outros ácidos; o linoleico é o ácido graxo essencial primário (CHEEKE, 1995).

O azeite de algodão contém os ácidos graxos ciclopropenóide, estercúlico e malvático, que induzem a existência de altos níveis de colesterol no sangue e também aterosclerose nos coelhos (FERGUSON et al., 1976).

Os lipídeos subcutâneos estão entre 40-50% dos lipídeos totais da carne. Os conteúdos em lipídeos intermuscular e perirenal aumentam com a idade (CHEEKE, 1995).

Tem-se observado um notável interesse no conteúdo de colesterol da carne de coelho, que se considera inferior a de outras carnes (RAO et al., 1979). BEYMAN (1984) tem sugerido que, devido as inter-relações entre o conteúdo em colesterol, ácidos graxos saturados e polinsaturados e conteúdo energético, 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 galinha e peru.

As saponinas são glicosídeos das forrageiras e leguminosas que determinam a queda dos níveis de colesterol nos animais que consomem alfafa (CHEEKE e SHULL, 1985). CHEEKE (1970) revisou os efeitos biológicos das saponinas e sugeriu que têm potencial para reduzir o conteúdo de colesterol nos produtos animais. BARICHELLO e FEDOROFF (1971) observaram boas propriedades nas farinhas de alfafa para reduzir os níveis de colesterol no soro, ao ser administrado nos coelhos, o que sugere a possibilidade de ter efeito sobre a redução dos níveis de colesterol nos tecidos. Em cães, COHEN et al. (1990) verificaram também o efeito de dietas contendo proporções diferentes de alfafa e sua relação com o metabolismo do colesterol e atribuíram esta ação à presença de flavonóides. Por outro lado, a análise de ácidos biliares extraídos da bile mostrou-se elevada à medida que se aumentava o nível de alfafa na dieta. Estes resultados confirmam a ação destes compostos flavonoídicos, pois sabe-se que o aumento da degradação do colesterol, aumenta a quantidade de ácidos biliares.

A desordem coronária (entupimento das artérias) é um dos problemas causados pelo acúmulo de colesterol e tem sido a causa da alta taxa de mortalidade no Brasil, Japão, Inglaterra, Estados Unidos e outros países (TRUSWELL, 1984). Os fatos relevantes que provocam este problema têm sido idade, sexo, predisposição genética, inatividade física, obesidade, stress emocional, diabete e nível elevado de lipídeos. O colesterol, um destes lipídeos, é precursor dos hormônios esteroidais, dos ácidos biliares e da vitamina D, além de ser um dos constituintes da membrana celular e da bainha de mielina. Típico do metabolismo animal, o colesterol é encontrado em carnes, fígado, rim e ovos (HARPER et al., 1979). Sintetizado em sua maior parte no fígado, um homem de 70 kg produz diariamente cerca de 840 mg, enquanto absorve, através dos alimentos, em torno de 450 mg (McNAMARA et al., 1987). Como prevenção da aterosclerose, as principais medidas previstas são: alteração no estilo de vida, intervenções farmacológicas (antiagregantes plaquetários, fármacos anti-hipertensivos, anticoagulantes, betabloqueadores, estrogênioterapia) e cirurgias vasculares (LEITE et al., 1994).

Experiências têm mostrado que não só o óleo de soja (MUKHERJEE e SENGUPTA, 1981), como também a diminuição de ácidos graxos saturados, como o palmítico e o esteárico, e o aumento dos ácidos insaturados como o linoléico e o linolênico na dieta, reduzem o nível do colesterol no sangue (CALDWELL et al., 1973). A absorção de colesterol, por sua vez, pode ser também reduzida, quando se administra dietas com alto teor de fibras (ANDERSON e CHEN, 1979 e VAHOUNY et al., 1988) e saponinas (SIDHU e OAKENFULL, 1986).

O colesterol está presente nos tecidos e nas lipoproteínas plasmáticas, 25% como colesterol livre e 75% esterificado com ácido graxo de cadeia longa, principalmente linoléico e oléico. É sintetizado em diversos tecidos, a partir de Acetil-CoA e eliminado, via bile, como colesterol ou sais biliares (MURRAY et al. 1988).

A maioria dos tecidos armazena colesterol na forma de ésteres de colesterila. A lipoproteína LDL é o mediador do ingresso de colesterol e dos ésteres de colesterila em diversos tecidos. Colesterol livre é removido dos tecidos pela lipoproteína HDL e transportado ao fígado para conversão em sais biliares. A LDL tem seu papel fundamental na gênese de aterosclerose,

podendo causar problemas cerebrovasculares, coronarianos e na circulação periférica. A aterosclerose coronariana está correlacionada a uma alta relação LDL:HDL (PINCKNEY e PINCKNEY, 1973).

Os lipídeos no soro existem na forma de lipoproteínas, contendo colesterol, ésteres de colessterila, triacilgliceróis e fosfolipídeos (PINCKNEY e PINCKNEY, 1973).

## **2.2 . Flavonóides e suas características químicas**

Os flavonóides estão presentes na dieta humana com ações e efeitos farmacológicos. Os flavonóides foram estudados por KUHNAU (1976), que descobriram que algumas flavonas e alguns flavonóis encontrados em alimentos são sintetizados pelas plantas pelo estímulo da luz e que as flavonas são mais facilmente encontradas naquelas partes da planta expostas à luz. Sua ocorrência em alimentos foi revisada por HERMANN (1976). Normalmente, os flavonóis ocorrem em misturas envolvendo O-glicosil-derivados e podem estar presentes na concentração de 50 a 100 mg/kg de frutos secos.

A concentração de flavonóis e flavonas em raízes é usualmente menor, mesmo assim, derivados glicosidados de flavonas, como a Liquiritigenina (7,4'-dihidroxi-flavanona), foram isolados de extratos de raízes de *Glycyrrizha uvalensis*, sendo utilizadas como adoçantes e apresentando também propriedades medicinais (NAKANISHI et al., 1985).

### **2.2.1 . Propriedades biológicas**

Os flavonóides, um grupo de compostos polifenólicos amplamente encontrados em plantas, principalmente leguminosas, tem sido relatados por exibir uma série de efeitos biológicos, entre os quais, destacam-se a inibição da peroxidação de lipídeos e a agregação plaquetária. Estes efeitos dos flavonóides são exercidos por suas propriedades antioxidantes, removedores de

radicais livres e queladores de cátions divalentes (HANNASAKI et al., 1994; FRAGA et al., 1987; CAVALLINI et al., 1978 e AFFANA'S et al., 1989).

LACKEMAN et al. (1986) relata que o flavonóide quercetina atua como inibidor da oxidação e citotoxicidade da LDL *in vitro*. Esta propriedade dos flavonóides leva a importantes conseqüências para a saúde, pois acredita-se que a oxidação da LDL seja aterogênica. Entretanto, flavonóis e flavonas podem também inibir a ciclooxygenase, levando a diminuição da agregação de plaquetas e uma redução da tendência trombocítica.

JAHROMI e RAY (1993) avaliaram os níveis séricos de lipídeos com hiperlipidemia induzida por triton e, após a administração de pterosupina e do flavonóide liquiritigenina, observaram que estas substâncias foram capazes de reduzir os níveis de colesterol, colesterol-LDL e índices aterogênicos. A pterosupina foi também eficiente na redução dos níveis de triacilgliceróis.

Estudos realizados sobre a relação estrutura atividade de flavonóides em relação à inibição da peroxidação de lipídeos explicam seu mecanismo de ação baseados em sua estrutura. A presença de grupo hidroxila na posição três do anel C presentes em quercetina, miricetina, catequina e morina apresentam potentes ações inibidoras da peroxidação lipídica (RATTY e DAS, 1988; AFFANA'S et al., 1989; MORA et al., 1990 e MOREL et al., 1993), e também ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 do anel C. A hidrogenação desta ligação diminui os efeitos antiperoxidativos (RATTY e DAS, 1988; CAVALLINI et al., 1978 e CHOLBI et al., 1991). O grupo carbonila em carbono 4 do anel C é necessário para a atividade antiperoxidante (RATTY e DAS, 1988; CAVALLINI et al., 1978 e MOREL et al., 1993). O número de grupos hidroxilas nos anéis A e B dos flavonóides tem importância na proteção contra radicais livres, evidenciando-se que quanto maior o número de hidroxilas substituídas no anel B, especialmente no carbono 3', maior a atividade antiperoxidativa (HUSAIN et al., 1987). Os grupos hidroxilas nas posições dos carbonos 5 e 7 do anel A, carbonos 3' e 4' do anel B e carbono 3 do anel C parecem contribuir para a ação antioxidante (DE WHALEY et al., 1990). Os flavonóides que possuem a hidroxila na posição 2', como a morina, possuem a propriedade antiperoxidativa (CHOLBI et al., 1991). Os grupamentos hidroxila em carbonos 3 e 5 (quercetina, morina) e carbonila formam quelatos com íons ferro. A habilidade dos flavonóides de seqüestrar íons metálicos contribuem para suas propriedades antiperoxidativas,

prevenindo a formação de radicais livres (AFFANA'S et al., 1989 e MORA et al., 1990).

Os flavonóides morina, naringenina, quercetina e rutina, foram testados no metabolismo lipídico de ratos machos Wistar (NAGEM et al., 1994), bem como seus derivados acetilados e metilados. Os animais submetidos a estes ensaios tiveram os teores de lipídeos no soro diminuídos e um aumento da concentração de sais biliares.

Vários estudos têm demonstrado associações entre o consumo de gordura saturada, nível de colesterol e doenças coronárias (CIORLIA, 1997), no entanto, medidas dietéticas isoladas têm-se mostrado, freqüentemente, insuficientes, tornando-se necessária a associação com drogas hipolipidêmicas, capazes de reduzir a síntese endógena de colesterol ou melhorar a eficiência de sua remoção no plasma.

Muitos fármacos encontram-se disponíveis com este propósito e, mesmo a combinação de alguns deles, têm apresentado efeito sinérgico na redução da concentração de lipídeos, sendo a combinação de efeitos, tais como, a elevação da fração colesterol-HDL e redução do colesterol-LDL no plasma, ideal na prevenção da aterosclerose (BROWN e GOLDSTEIN, 1990).

No entanto, efeitos colaterais indesejáveis no uso de tais medicamentos, além do elevado custo associado, têm motivado a procura de novas estratégias nutricionais e, ou, farmacológicas para a prevenção da aterosclerose, baseadas, sobretudo, no controle das concentrações plasmáticas de colesterol. Recentemente, a hipótese de que a peroxidação lipídica desempenhe um importante papel na patogênese da aterosclerose, vem despertando crescente entusiasmo sobre o uso de antioxidantes como agentes antiaterogênicos (BATLOUNI, 1997).

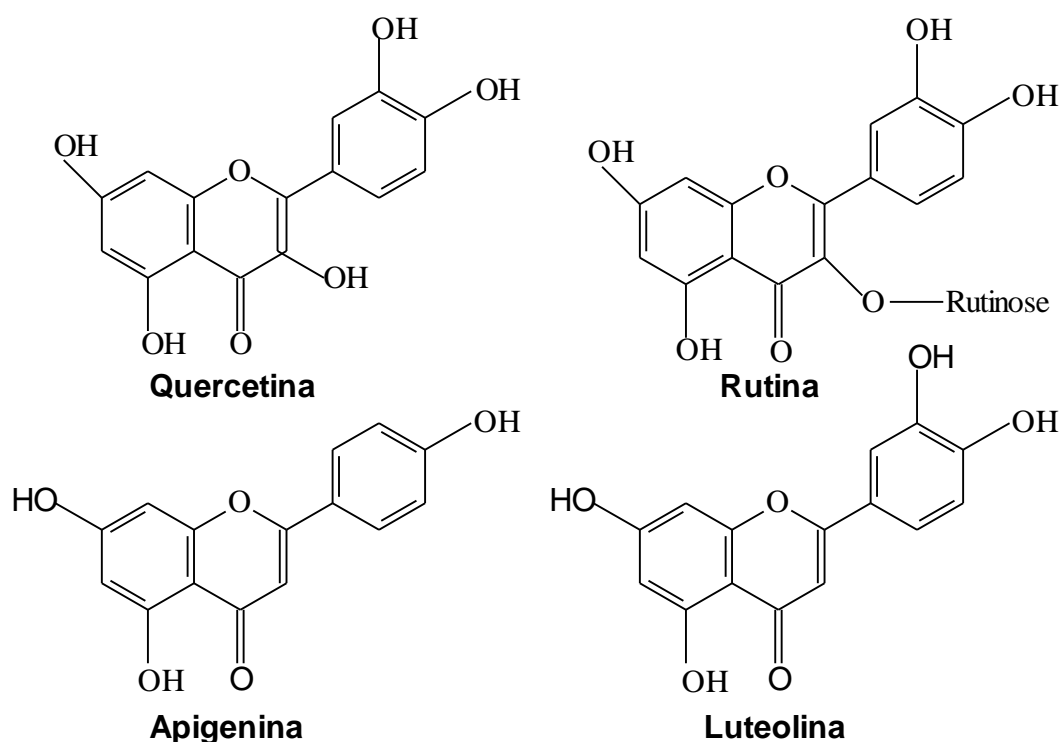


Figura 1 - Estrutura da quercetina, rutina, apigenina e luteolina.

Alguns flavonóides, como a quercetina, que é da classe dos flavonóis, possuindo grupamentos hidroxila nas posições 2' e 4' do anel benzênico ligado ao carbono 2 do grupo pirânico, inibem a liberação de histamina em processos alérgicos, induzida por antígeno. O efeito inibitório não depende só da estrutura química, mas também da natureza do estímulo.

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

Estudos feitos por SUDHEESH et al. (1997) demonstraram que os flavonóides extraídos das frutas *Solanum melongena* (Beringela) administrados na dose de 1 mg/ 100g do peso corporal / dia tiveram uma ação hipolipidêmica significativa em ratos normais e alimentados com colesterol. As atividades de

glicose-6-fosfato desidrogenase e malato desidrogenase estavam reduzidas. Já as atividades da lipase lipoprotéica e da lecitina colesterol acil transferase (LCAT) do plasma mostraram um significativo aumento. Foi observado um aumento significativo nas concentrações de ácidos biliares hepáticos e fecais e esteróides neutros fecais, também indicando uma taxa mais alta de degradação de colesterol.

Os efeitos farmacológicos de Oren-gedoKu-to (OGT), uma mistura de plantas medicinais da tradicional medicina japonesa-chinesa, em biossíntese de lipídeos, foram investigados em culturas de células hepáticas humanas HepG2. A adição de OGT (0,5 e 4,2 mg/ml), que não teve nenhum efeito em conteúdo de proliferação de células, causou uma diminuição considerável no conteúdo de colesterol celular, particularmente em éster de colesterol contido na incubação de 24 h. A incorporação de  $^{14}\text{C}$ -oleato em fração de éster de colesterol celular também estava notavelmente reduzida durante incubação de 6 e 24 h. Os efeitos dos componentes da OGT e suas substâncias químicas ativas principais sobre a atividade da acil-coenzima A:colesterol aciltransferase (ACAT) foram estudadas “in vitro” para explorar o mecanismo pelo qual OGT inibe a formação de éster de colesterol. Os dados confirmaram que o OGT, na “dose-dependente”, e seus componentes extraídos de *Scutellaria baicalensis*, *Coptis japonica*, *Gardênia jasminoides* e *Phellodendron amurense* notavelmente inibem a atividade de ACAT. Entre as substâncias químicas ativas principais de OGT, a baicaleína diminui a atividade de ACAT no nível da dose de  $10^{-6}$  mol/L. Estes resultados sugerem fortemente que OGT reduz a formação de éster de colesterila em hepatócitos humano, inibindo ACAT e que a baicaleína, em parte, é a responsável pela inibição de ACAT (YOTSUMOTO et al.,1997).

Os efeitos benéficos dos flavonóides presentes na dieta humana têm aumentado consideravelmente por numerosos aspectos associados com doenças e desordens. Recentemente tem sido determinado que flavonóides extraídos da casca de frutas cítricas são manufaturados e processados para serem utilizados como suplementos alimentares para humanos e animais. Têm efeito sobre a fragilidade e permeabilidade capilar, têm ação antibacteriana, anti-fúngica e anti-viral, podendo ser considerada para uso no combate às infecções (HUET, 1982).

Foram testados por BOK et al. (1999) os efeitos do extrato da casca de mexerica e uma mistura de dois flavonóides extraídos de frutas cítricas sobre o colesterol sangüíneo. Ratos masculinos foram alimentados com uma concentração de 1g/100g na dieta de colesterol, durante 42 dias, com suplementos de extrato da casca da mexerica ou uma mistura de naringina e hesperidina na dose de (0,5g/100g). Estudando os efeitos no plasma e sobre os lipídeos hepáticos e, também, as atividades das enzimas hepáticas e ainda a excreção de esterol neutro fecal, foram observados que o extrato da casca da mexerica e a mistura de dois flavonóides abaixaram significativamente os níveis (média  $\pm$  SE) de colesterol no plasma, colesterol hepático e triacilgliceróis hepático, comparando esses com o controle (quadro 1). As atividades do 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) redutase e acil CoA: colesterol O-aciltransferase (ACAT) era significativamente baixa nos grupos experimentais que no controle (quadro 2). Estes suplementos também reduziram substancialmente a excreção do esterol neutro fecal, comparado ao controle (extrato da casca de tangerina (211,1  $\pm$  26,7 mg/d), hesperidina + naringina (208,2  $\pm$  31,6 mg/d) e o controle (521,9  $\pm$  53,9 mg/d)). O resultado da inibição das atividades do 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) redutase e acil CoA: colesterol O-aciltransferase (ACAT) do suplemento do extrato da casca da mexerica ou a combinação de seus bioflavonóides poderiam responder pela diminuição no esterol neutro fecal que parece compensada pela biossíntese de colesterol diminuída no fígado.

Quadro 1 - Efeito de casca de tangerina e flavonóides durante seis semanas sobre lipídeos do plasma e hepáticos em ratos alimentados com colesterol.

Constituintes no plasma	Grupos		
	1- Controle	2- Hesperidina + Naringenina	3- Extrato de casca de tangerina
Colesterol total no plasma (mmol/L)	3,80 ± 0,28 a	2,42 ± 0,31 b	2,44 ± 0,59 b
Colesterol-HDL (mmol/L)	0,57 ± 0,05	0,71 ± 0,04	0,61 ± 0,04
Colesterol-HDL/Colesterol <sup>2</sup> total	0,157 ± 0,016 a	0,299 ± 0,08 b	0,262 ± 0,075 b
Triacilgliceróis (mmol/L)	1,12 ± 0,07	1,03 ± 0,13	1,22 ± 0,18
Índice aterogênico <sup>3</sup>	6,3 ± 1,1 a	2,6 ± 1,1 b	3,1 ± 1,2 b
Colesterol hepático (mmol/L)	0,181 ± 0,003 a	0,131 ± 0,0010 c	0,143 ± 0,017 b
Triacilgliceróis hepáticos (mmol/L)	0,095 ± 0,002 a	0,075 ± 0,006 b	0,069 ± 0,007 b

1- Média ± erro-padrão, n = 10

2- Colesterol HDL / colesterol total.

3- (Colesterol total - Colesterol-HDL) / Colesterol-HDL. <sup>a b c</sup>Médias diferentes (P < 0,05)

Fonte: BOK et al., 1999.

Quadro 2 - Efeito de casca de tangerina e flavonóides durante seis semanas sobre as enzimas 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA e acil CoA colesterol O-acil transferase.

Enzimas	Grupos		
	1- Controle	2- Hesperidina + Naringenina	3- Extrato de casca de tangerina
3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA	2487,0 ± 210,0 (pmol.min <sup>-1</sup> .mg. proteína <sup>-1</sup> )	1783,0 ± 282 (pmol.min <sup>-1</sup> .mg. proteína <sup>-1</sup> )	1565 ± 106,0 (pmol.min <sup>-1</sup> .mg. proteína <sup>-1</sup> )
Acil CoA colesterol O-acil transferase	806,0 ± 105,0 (pmol.min <sup>-1</sup> .mg. proteína <sup>-1</sup> )	615 ± 80 (pmol.min <sup>-1</sup> .mg. proteína <sup>-1</sup> )	548 ± 65,0 (pmol.min <sup>-1</sup> .mg. proteína <sup>-1</sup> )

Fonte: BOK et al., 1999.

Recentemente, tem sido determinado que o suco de uva aumenta a bioviabilidade sistêmica de certas drogas como a felodipina e a dihidropirina cálcica (antagonista) (BAILEY et al., 1994).

Similarmente, o consumo diário de suco de uva aumenta a concentração de ciclosporina no plasma de pacientes que receberam transplante de rins. Estas interações com drogas podem ser atribuídas aos efeitos farmacocinéticos de substâncias presentes no suco, como os flavonóides (naringina e antocianinas) (MIDDLETON e KANDASWAMI, 1994).

Tem sido pesquisado também que processos de imunidade e inflamação em células podem ser afetados por diversos flavonóides como a quercetina, tangeretina, fisetina e outras. Quercetina tem sido estudada por afetar a secreção e a resposta mutagênica de várias células, incluindo a inibição de estímulos fitomutagênicos em linfócitos (MOOKERJE et al., 1986 e DE WHALEY et al., 1990).

Flavonóides isolados de plantas são usados como tranqüilizantes em medicamentos populares e têm uma afinidade seletiva para receptores de benzodiazepínicos centrais (BDZ-Rs) e alguns deles possuem um perfil farmacológico compatível com a ação de agonista parcial. Derivados sintéticos, no núcleo comum da flavona, permitiram obter ligantes de alta afinidade quando são introduzidos grupos eletronegativos em carbonos 6 e, ou, 3'. Combinações representativas como o 6,3'-dinitroflavona e 6-bromo-3'-nitroflavona exibiram uma alta afinidade para o BDZ-Rs ( $K_i = 1.5$  a  $30$  nM) e têm efeito ansiolítico, não sendo associados como relaxante muscular, sedativo ou ações amnésicas. Estas combinações ou similares poderiam conduzir a drogas terapêuticas melhoradas no tratamento de depressão (MEDINA et al., 1998).

As flores dos ramos de *Chrysanthemum morifolium* têm sido usado como um chá herbário na medicina popular chinesa e é conhecido como "Ju Hua". Elas foram pesquisadas por possuir atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antigripais e antiinflamatórias. Na procura por agentes anti-AIDS, na lista dos produtos naturais, o extrato metanólico da flor da *C. morifolium* apresentou uma espetacular atividade significativa de anti-HIV. O fracionamento e testes com os extratos mostraram sua bioatividade, conduzindo ao isolamento de oito flavonóides conhecidos. Uma destas combinações tem

sido identificada como um princípio ativo anti-HIV ativo novo, levando à estrutura do flavonóide a 7-O-β-D- galactopiranosil-acacetina- (HU et al., 1994).

O efeito de citoproteção das prostaglandinas foi estudado extensivamente (ROBERT, 1979; SCHMIDT et al., 1985 e TARNAWSKI et al., 1985). Citoproteção gástrica é definida como a prevenção de dano da mucosa gástrica por mecanismos diferentes de inibição ou neutralização de secreção ácida gástrica. Este efeito de citoproteção também foi descrito por um número grande de outras substâncias, inclusive flavonóides (KONTUREK et al., 1986 e RAINOVA e NAKOV, 1988). Vários flavonóides previnem lesões de mucosas gástricas produzidas por vários métodos experimentais de indução da formação de úlceras experimentais e protegem a mucosa gástrica contra vários agentes de necrose (ALCARAZ e TORDERA, 1988; PARMAR e GHOSH, 1981; ALARCÓN DE LA LASTRA et al., 1992; MARTÍN et al., 1993 e MOTILVA et al., 1992, 1994). Rutina, um derivado de flavona natural, também foi usado para prevenir ulceração da mucosa gástrica em cobaias, incluindo diminuição do stress (BARNAULOW et al., 1982, 1983). Esta flavona é conhecido por ter atividade antiinflamatória e ter propriedades vasodilatadoras, produzindo diminuição da permeabilidade capilar e mostrando um efeito de vasoconstrição nos vasos sanguíneos periféricos (EVANS, 1989).

Um dos elementos centrais do sistema de defesa da mucosa gástrica é o fluxo de sangue. É reconhecido que este fluxo também é o pivô na restituição da mucosa e nos processos curativos. Também é bem aceito agora, que os rápidos desenvolvimentos da injúria microvascular e a estase venosa são elementos chaves na patogênese de lesões agudas da mucosas (GUTH e LEUNG, 1987; WHITTLE, 1989). Estes são os fatos que formam a base para o estudo da rutina como, uma possível droga protetora da lesão gástrica induzida por etanol, vendo-se que este modelo é acompanhado por edema, lesão e hemorragia (GUERRERO et al., 1994).

Investigação de flavonóides, usando cromatografia de camada fina, mostrou que *Chenopodium murale* L. revelou a presença de três componentes. O principal foi identificado como 3,7-dirhamnosil-kaempferol – composto 1 (kaempferitrina; lespedina) por seus espectros PF, UV, IV, EM e RMN (H-H COSY e H-C HETCOR). Testando o efeito do composto 1, como também a mistura de flavonóides totais no sistema cardiovascular de coelhos, observou

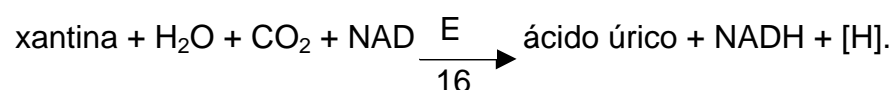
que há uma dose relacionada à hipotensão e bradicardia. Também o componente 1 gerou uma hipotensão relacionada com a dose em ratos geneticamente propensos a hipertensão. O composto 1 não bloqueou  $\alpha_1$  ou  $\beta_1$ -adrenoceptores, quando testados, usando isoladamente aorta e os átrios de porquinhos da Índia, respectivamente (GOHAR e ELMAZAR, 1997).

Vários pesquisadores estudam aplicações de flavonóides como agentes antioxidantes (LARSON, 1988), anti-fúngicos (SMITH e BANKS, 1986) e fitoalexinas (PATRONI et al., 1982).

O efeito hipocolesterolêmico das leguminosas tem sido observado não só em *Cicer arietanum* (MATHUR et al., 1964), como também em extratos de feijão (RIGOTTI et al., 1989), em alfafa (COHEN et al., 1990) e em frações não hidrolisadas e hidrolisadas de proteínas de soja (MICHIIRO et al., 1990 e TERPSTRA et al., 1984). Já em micromoléculas naturais isoladas de diversas fontes vegetais, os resultados mais satisfatórios nesta área foram apresentados pela Quercetina (MAGGIO, 1956 e KATO e TOSA, 1983), Marsupina, Pterosupina, Liquiritigenina (FARBOODNIAY e ANIL, 1993), Catequina (MANGIAPANE et al., 1993), Hesperidina (BOUSKELA et al., 1993), Luteolina, Haplogeninina-7-O-glicosil, Haplosídeo A, Pectolarigenina, e Hispidulina (SYROV et al., 1985).

A enzima xantina oxidase catalisa a oxidação de hipoxantina em xantina e, desta, em ácido úrico, que desempenha um importante papel na “gota”. Durante a reoxidação da xantina oxidase, se produz radical superóxido e peróxido de hidrogênio, espécies químicas que contribuem para o stress dos organismos, característicos de vários processos patológicos, como câncer, inflamação e aterosclerose (COS et al., 1998).

A xantina oxidase é capaz de catalisar a formação de urato e ânion superóxido de xantina. Durante a atividade física existe a formação de radicais livres, através de vários processos, um desses é chamado de isquemia (hipoxia) e os primeiros minutos de reperfusão (reoxigenação) ocorrendo a lesão tecidual. No processo isquêmico, o ATP é catalisado para hipoxantina, que se acumula no interior dos tecidos. A enzima xantina oxidase (abundante no intestino, cérebro, coração e fígado) é formada pela xantina desidrogenase, que age reduzindo a nicotinamida adenina- dinucleotídeo (NAD):



Na presença de processos isquêmicos, a xantina desidrogenase se converte em xantina oxidase. Esta última facilita a produção dos radicais livres:



Portanto, o efeito biológico dos flavonóides, como inibidor da xantina oxidase, impede a formação de radicais livres e a formação de ácido úrico, muito aumentado na gota (LOTUFO et al., 1996).

Em estudos realizados por MOULIN et al. (1994), foi verificado inibição da atividade de lipase extraída do látex de *Euphorbia characias*, quando se usou p-nitrofenil fosfato de dietila.

Foi investigada por YOKOZAWA et al. (1997) a atividade antioxidativa dos flavonóides do tipo flavona e flavonol, usando um sistema de peroxidação lipídica mediado pela adição de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{+2}$  em homogenato de fígado de ratos. Os resultados mostraram que ambos os tipos especificados e marcados reduziram a produção de peroxidantes induzida por  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ , numa reação do tipo Fenton. A habilidade de retirar radicais livres destes compostos foi associada com a estrutura química deles, especialmente com o número de grupos hidroxila unidos ao esqueleto básico. Porém, havia exceções que não só implica a atividade relacionada aos grupamentos hidroxilas, mas também a determinadas configurações deles.

Flavonóides C-metilados, recentemente descritos, como 6,8-dimetilquercetina 3-metóxi; 6-metilquercetina 3,7-dimetóxi; 6,8-di-metilquercetina 3,7-dimetóxi; junto com os conhecidos compostos quercetina; quercitrina; 6-metilquercetina 3-metóxi, 6-metilquercetina 3,7,3'-trimetóxi; 6,8-di-metilkaempferol 3-metóxi e 6,8-di-metilkaempferol 3,7-dimetóxi, isolados das folhas de *Ptilostigma thonningii*, foram testados por ter seus efeitos de inibição da síntese de prostaglandina *in vitro* e sua atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. A influência do anel B dos grupos 3',4' diol na atividade de C-metilflavonóis na inibição da síntese de prostaglandina diferem do que foi observado para uma série de flavonóides sem grupos de C-metil. Foram relacionados os usos tradicionais da planta em infecções e condições inflamatórias com base nas atividades deste compostos (IBEWUIKE et al., 1997).

SILVÁN et al. (1998) estudaram os efeitos de quatro compostos flavonoídicos extraídos da *Tanacetum microphyllum* e uma lactona

sesquiterpênica, no metabolismo do ácido araquidônico, testada em sistemas celulares. No ensaio, observou-se liberação da prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e leucotrieno 4 (LTC<sub>4</sub>); a maioria das combinações não exibiu efeito significativo. Apenas a hidroxiachillina e os flavonóides centaureidina e 3',5-dihidroxi-4',7-dimetóxi flavona mostraram um efeito significativo, embora com menos potência que as drogas de referência, indometacina e ácido nordihidroguaiarético (NDGA). Porém, todos os compostos inibiram a liberação de tromboxano B-2 (TXB<sub>2</sub>) do ionóforo de plaquetas humanas. A ação foi mais acentuada com os flavonóides santina e ermanina.

Daflon (500 mg) é um medicamento que consiste na mistura de dois flavonóides, diosmina 450 mg e hesperidina 50 mg. Este medicamento contém, além dos flavonóides, carboximetilamido sódico, celulose microcristalina, gelatina, estearato de magnésio, talco, oleato de glicerol, hidroxipropil metilcelulose, polietilenoglicol, laurisulfato de sódio, óxido de ferro amarelo, óxido de ferro vermelho, dióxido de titânio, cera branca de abelha (q.s.p), para um comprimido de 660 mg. Este comprimido tem propriedades venotônicas e vasculoprotetoras. No homem, após a administração por via oral do medicamento, verifica-se rápida absorção pela mucosa digestiva, forte metabolização, que é evidenciada pela presença de diferentes fenóis ácidos na urina, meia-vida de eliminação de 11 horas, com excreção essencialmente fecal (80%) e urinária de aproximadamente de 14%. STUCKMANN e NICOLAIDES (1994) descrevem os efeitos do Daflon na microcirculação de insuficiência venosa crônica, melhorando o tônus venoso, inibindo a síntese de prostaglandina, protegendo a formação de radicais livres e aumentando a drenagem linfática. Em termos gerais, sua eficiência terapêutica se dá pela redução da capacitância venosa, diminui a distensibilidade venosa, normaliza a permeabilidade capilar, reforça a resistência capilar e reduz a estase venosa. É utilizado no tratamento da insuficiência venosa crônica, funcional e orgânica dos membros inferiores.

Os níveis de lipídeos sanguíneos de ratos com hiperlipidemia, que é o resultado de uma alimentação gordurosa, foram tratados com flavonóides (+)-catequina, prunina (=7-O-glicosil-naringenina) e 5-O-glicosil-hesperetina, extraídos originariamente com metanol de *Prunus davidiana*. A administração do extrato metanólico desta planta, em 3 dias, produziram uma diminuição

significativa dos triacilgliceróis e colestetol total do sangue e o índice aterogênico também foi melhorado. A (+)-catequina foi efetivo na redução do nível elevado de triacilgliceróis. Prunina e 5-O-glicosil-hesperetina não mostraram efeito significativo nos níveis de triacilgliceróis no sangue de ratos hipertrigliceridêmico, mas exibiram efeito nos níveis de colesterol em ratos hipercolesterolêmico (CHOI et al., 1991).

Foram extraídos sessenta e cinco flavonóides naturais de várias classes químicas para verificar a habilidade deles na inibição da atividade procoagulante de monócitos aderentes em humanos, estimulada por endotoxina e interleucina-1 $\beta$  *in vitro*. Dezoito desses compostos inibiram a expressão da interleucina-1 $\beta$  do fator tissular de monócitos humanos, mas o composto mais ativo foi o biflavonóide hinokiflavona (LALE et al., 1996).

A suscetibilidade para aterosclerose é determinada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais, inclusive dietéticos. Consumo de dietas ricas em proteína de soja foi indicado para proteger o desenvolvimento de aterosclerose. Mecanismos potenciais incluem a redução do colesterol, inibição da oxidação de lipoproteína LDL e inibição da proliferação celular por proteínas de soja ou isoflavonas, como genisteína, que estão presentes na soja. Este estudo foi realizado para determinar se as isoflavonas de soja conferem proteção à aterosclerose em camundongos e se elas reduzem o nível de colesterol do soro e a oxidação de lipoproteína LDL. C57BL/6 (modelo genético que contém baixo nível de colesterol HDL) e ratos com deficiência de receptores de LDL (LDLr-nulo) que foram alimentados com uma dieta gordurosa, contendo proteína de soja, com presença de isoflavonas (IF) (IF+ 20,85 g/100 g de proteína, 0,027 g/100 g de genisteína, 0,009 g/100 g de daidzeína) ou dietas da qual isoflavonas e outros componentes tenham sido extraídos (IF -, 20,0 g/100 g de proteína, 0,002 g/100 g de genisteína, 0,001 g/100 g de daidzeína). Pelo fato de camundongos sem receptores de LDLr desenvolverem extensivamente a aterosclerose e hipercolesterolemia, depois de um tempo mínimo com uma dieta gordurosa, eles foram alimentados com esta dieta durante 6 semanas e os ratos C57BL/6 foram alimentados com a dieta durante 10 semanas. Os níveis de colesterol plasmático não diferiram entre os camundongos sem receptores de LDL (modelo genético que continha alto teor de LDL na circulação) e aqueles alimentados, na ausência de isoflavonas, com receptores. Já os alimentados

com isoflavonas, tiveram os seus níveis de colesterol reduzidos em 30% para os do tipo C57BL/6, comparados aos que não receberam isoflavonas. A suscetibilidade da modificação oxidativa da LDL foi medida pela formação de um dieno conjugado em camundongos sem receptores de LDL, mas não foi alterado pelo consumo de isoflavonas. Todos os camundongos sem receptores de LDL desenvolveram aterosclerose, na presença e ou deficiência de dieta contendo isoflavonas. A lesão da área aterosclerótica foi significativamente reduzida nos camundongos C57BL/6 alimentados com isoflavonas e quando comparados com os alimentados sem isoflavonas. Assim, este estudo feito por KIRK et al. (1998) demonstrou que dietas contendo isoflavonas resultaram na redução no nível do colesterol em camundongos do tipo C57BL/6. Já no modelo animal com camundongos sem receptores de LDL (LDLr-nulos), não foi observado efeito no nível de colesterol e nem sobre a modificação oxidativa da LDL. Verificou-se que as isoflavonas na dose testada não protegeram os camundongos do desenvolvimento da aterosclerose em ratos deficientes em receptores de LDL, mas diminuíram a aterosclerose em camundongos C57BL/6. Estes estudos sugerem que isoflavonas de soja podem reduzir os níveis de colesterol, por aumentar a atividade dos receptores de LDL no fígado e esta redução do colesterol pode oferecer uma proteção à aterosclerose.

Em estudos com as sementes de *Aesculus hippocastanum L.*, isolou-se uma mistura complexa de glicosídeos saponina de triterpenóides, nomeada aescina, flavonóides como a quercetina e kaempferol, taninos, alantoína, aminoácidos, adenina, adenosina, guanina e outros componentes. Foi verificado que a aescina possui atividade antiinflamatória, porém o extrato da planta, chamada castanheira de cavalo, teve uma atividade maior. Testes realizados com o extrato da planta sem aescina sugerem que a castanheira de cavalo contenha outros agentes antiinflamatórios diferentes da aescina (TSUTSUMI e ISHIZUKA, 1967).

Outros estudos realizados por HAAS (1991) mostraram que a aescina tem a habilidade de inibir atividade de enzimas lisossômicas e a filtração por transcilaridade de água e proteínas, reduzindo o diâmetro e, ou, o número de poros capilares. A aescina também aumenta o tônus capilar das veias e melhora o retorno do fluxo de sangue para o coração.

REHN et al. (1996) fizeram um controle em um experimento durante quatro semanas, envolvendo 137 pacientes com insuficiência venosa crônica e mostraram um efeito antiedematoso, testando o extrato da castanheira de cavalo. Resultados semelhantes foram obtidos através de DIEHM et al. (1996) e GREESKE e POHLMANN (1996). Todos estes resultados confirmam o prévio estudo em humanos (NEWALL et al., 1996) e o efeito dos sintomas, normalmente registrados (dor, fadiga, tensão, volume da perna, coceira e tendência para edema), melhorando ou desaparecendo depois do tratamento com extrato da castanheira de cavalo. Este extrato também reduz a atividade de proteoglicanos, substâncias capazes de modificar a rigidez capilar e o tamanho dos poros. O extrato da semente de castanheira de cavalo testado continha de 16% a 21% de glicosídeos triterpênicos, calculados como aescina. Neste experimento, inicialmente, a dose diária foi de 90-150 mg de aescina via oral, mas com a melhora pôde ser reduzido a doses diárias de 35-70 mg. A castanheira de cavalo, no entanto, pode ser irritante para o trato gastrointestinal e pode interferir com terapia coagulante/anticoagulante. Sugere-se que deve ser evitado por pacientes sem um dos rins ou com deterioração hepática (MASCOLO et al., 1998).

No estudo feito por DE WHALLEY et al. (1990), foi mostrado que certos flavonóides, componentes de plantas encontradas na dieta, são potentes inibidores na modificação de  $^{125}\text{I}$ -LDL lábil através de macrófagos, com valores  $\text{IC}_{50}$  na variação micromolar (por exemplo: morina e fisetina 1  $\mu\text{M}$ ; quercetina e gossipetina 2 $\mu\text{M}$ ). Lipoproteínas de baixa densidade (LDL) podem ser oxidativamente modificadas *in vitro* através de macrófagos e certos outros tipos de células, de forma que macrófagos os modificarão muito mais rapidamente. Este processo pode ser importante na formação de células espumosas carregadas com colesterol, derivada de macrófagos em lesões ateroscleróticas. As potências individuais dos flavonóides, inibindo modificação da LDL não foram correlacionadas com as inibições de 5-lipoxigenase e ciclo-oxigenase. A modificação da LDL por macrófagos ocorre durante um período de cerca de 4-6 horas antes de ser detectada. Durante este tempo, há uma depleção rápida em seu conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol (um antioxidante endógeno encontrado em lipoproteínas), seguido por um grande aumento no nível de hidroperóxidos. Os flavonóides foram capazes de conservar o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol dos LDLs e

diminuíram a peroxidação lipídica. Os flavonóides também inibiram a oxidação de células livres de LDL mediadas por CuSO<sub>4</sub>. Estes estudos aumentam a possibilidade de que flavonóides podem proteger LDL contra oxidação em lesões ateroscleróticas, podendo ser então componente anti-aterosclerótico natural da dieta, embora isto dependa da farmacocinética deles.

Uma nova flavona 6"-O-glucosíe isovitexina (1), e três flavonóides conhecidos, quercetina, isovitexina, e 7-O-β-D-glicosil-luteolina, isolados da planta *Gentiana arisanensis* de Hayata foram identificados. Os novos compostos foram caracterizados por métodos espectrais. Em testes biológicos, o efeito antiplaquetário de 6"-O-glicosil isovitexina (1), isoorientina (2), 2 peracetato (3), isovitexina (4), 7-O-β-D-glicosil-luteolina (5), luteolina (6), isoorientina 6"-O-glicosil (7), e 7 peracetato (8) foram estudados, utilizando plaquetas sangüíneas de coelho. Dos compostos testados, o 6 mostrou potente efeito antiplaquetário em reações com o ácido araquidônico (AA) (IC<sub>50</sub> = 43,5 μM). O efeito dos compostos 2, 5, e 6 na contração da aorta torácica de rato também foi estudado. O composto 6 deprimiu notadamente a contração média induzida por Ca<sup>2+</sup> (1,9 mM) e em alta concentração de K<sup>+</sup> (80 mM), com IC<sub>50</sub> próximo de 156 μM (LIN et al., 1997).

GALVES et al. (1995) testaram as atividades antiperoxidativas de oito flavonóides na peroxidação de lipídeos induzidos em membranas de células de fígado, através do método não enzimático (sistema ácido ascórbico-Fe<sup>2+</sup>, FeAs) ou através do método enzimático (ácido araquidônico, AA). Quando a peroxidação de lipídeos foi induzida por FeAs, a ordem na potência inibitória para os diferentes flavonóides analisados foram: (-)-epicatequina luteolina > quercetina (+)-catequina > delphinidina > kaempferol >> apigenina > naringenina. Porém, quando a peroxidação de lipídeos é induzida por AA, a ordem de potência foi notadamente modificada: delphinidina > (-)-epicatequina > (+)-catequina > kaempferol > quercetina > luteolina > naringenina > apigenina. Também foi testada a influência destes flavonóides sobre a atividade das enzimas relacionadas a glutathione. Pode-se concluir, deste estudo, que o efeito antiperoxidativo foi mostrado pela maioria dos flavonóides sem modificar as enzimas citadas.

## **2.3 . Corantes naturais**

Para os corantes naturais, as informações e divulgações para a atividade biológica são ainda limitadas, porém a literatura já registra o uso de alguns corantes no controle do colesterol.

Os corantes naturais fenólicos, como as antocianinas (que são também uma classe de flavonóides), têm a propriedade de complexar com íons metálicos, tendo propriedades antioxidantes e habilidades para ligar com outras moléculas, incluindo as macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos.

Os corantes naturais carotenóides são precursores da vitamina A, que exercem numerosas funções no organismo, como ação protetora na pele e mucosas e papel essencial na função da retina e da capacidade funcional dos órgão de reprodução.

O principal uso dos corantes naturais é hoje voltado para as indústrias alimentícias, e o corante mais utilizado em todo o mundo é o urucum.

### **2.3.1 . Propriedades biológicas de carotenóides**

Os carotenóides mais importantes identificados em plasma ou soro incluem beta caroteno, alfa caroteno, licopeno, criptoxantina e luteína com alguma zeaxantina. As concentrações no soro não só dependem da dieta, mas também de fatores como destruição do trato gastrointestinal, eficiência de absorção e metabolismo e taxa de captação do tecido. Em pessoas bem nutridas, aproximadamente 1% do total de carotenóides do corpo (100-150 mg) é encontrado no soro (GERSTER, 1993).

Carotenóides que são transportados no sangue através de lipoproteínas (LDL, VLDL e HDL), parece se concentrar particularmente nos tecidos, com um grande número de receptores LDL e uma alta taxa de captação de lipoproteína, como no fígado, adrenais e testículos (GERSTER, 1993).

Além de sua função como precursores da vitamina A, se tem atribuído aos carotenóides outras atividades biológicas, tais como o aumento da comunicação entre as uniões “gap”, estimulação do sistema imunológico e atividade antioxidante (HOSSAIN et al., 1993). Estas propriedades específicas

dos carotenóides tem sido discutidas no contexto de sua atividade preventiva contra o câncer.

A vida aeróbica está associada a formação de espécies reativas do oxigênio e a vários sistemas de defesa, entre os quais se incluem os antioxidantes implicados na detoxificação destes intermediários reativos (SIES, 1993). Os carotenóides são parte da linha de defesa antioxidante e estão implicados principalmente na desativação do oxigênio singleto molecular e radicais peróxido. O oxigênio singleto é produzido na reação de intercâmbio de energia, quando um sensibilizador é excitado por uma luz e subseqüentemente transfere sua energia ao oxigênio no estado fundamental. As porfirinas, clorofilas, bilirrubina ou riboflavinas são exemplos de sensibilizadores endógenos no sistema biológico.

Desde o estudo de FOOTE e DENNY (1968) o  $\beta$ -caroteno é conhecido como um eliminador eficaz do oxigênio singleto. Outros carotenóides como o licopeno, o  $\alpha$ -caroteno e um número de xantofilas também são ativadas na eliminação do oxigênio singleto. A desativação do oxigênio simpleto pelos carotenóides é produzida principalmente por uma eliminação física. Este processo implica na transferência da energia de excitação do oxigênio simpleto ao carotenóide no estado fundamental, produzindo uma formação de oxigênio no estado fundamental e um carotenóide tripleto. A energia do carotenóide excitado se dissipa através das interações entre o carotenóide e o solvente que foi usado para sua recuperação no estado fundamental, produzindo energia térmica. O carotenóide permanece intacto através do processo de eliminação física e pode ser introduzido em outro ciclo de desativação (TRUSCOTT, 1990; STAHL e SIES, 1993).

Uma diferença da desativação dos radicais peróxidos pelos carotenóides implica numa reação química entre o radical e o carotenóide. O carotenóide é modificado quimicamente nesta interação, e os produtos resultantes são antioxidantes menos reativos. Com relação a química da reação carotenóide-radical peróxido, não deve ser elucidada sem ser identificado vários produtos da oxidação, como apocarotenóis e epóxidos de carotenóides (McCLURE e LIEBLER, 1995). O processo de eliminação de radicais peróxidos pelos carotenóides, depende da pressão de oxigênio no sistema. O  $\beta$ -

carotenóide tem mostrado ser um melhor oxidante a baixas pressões de oxigênio. Se tem demonstrado que os carotenóides atuam sinergicamente com outros antioxidantes (BURTON e INGOLD, 1984). Uma combinação de  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -tocoferol, proporciona uma melhor proteção contra os pro-oxidantes que os compostos individuais (PALOZZA et al., 1992).

As transformações de fibroblastos pelos carcinógenos é inibida por retinóides e carotenóides, sendo que sua potência inibidora está correlacionada com sua capacidade para induzir a comunicação entre as uniões "gap". As uniões "gap" são canais entre as membranas que permitem a difusão de moléculas entre células conectadas, e estão provavelmente implicada no número de vias de sinais. Fazendo-se tratamentos com  $\beta$ -carotenóide e cantaxantina, a comunicação entre as uniões "gap" das células aumenta. Sendo que a cantaxantina, um carotenóide não-provitamina A, regula também a comunicação entre as uniões "gap", é especulado se estes compostos influem diretamente neste processo ou devem ser metabolizados antes, nos retinóides ativos. Recentemente se tem demonstrado que pelos menos um produto da decomposição da cantaxantina, é um indutor muito eficiente da comunicação entre as uniões "gap" *in vitro* (HANUSCH et al., 1995). Se tem identificado o ácido 4-oxoretinóico como um produto da autooxidação da cantaxantina com propriedades indutoras da comunicação entre as uniões "gap" comparadas com as do ácido retinóico. Deste modo, os carotenóides atuariam como precursores dos retinóides com diversas estruturas das quais poderiam ter interessantes propriedades fisiológicas.

Os carotenóides não-beta caroteno não têm, contudo, sido submetidos a estudos detalhados de toxicidade (GERSTER, 1993).

O efeito anticarcinogênico de carotenóides em modelos *in vitro* e *in vivo* foram extensivamente revisados em animais. Apesar do grande número de estudos, a conexão entre a função antioxidativa de carotenóides e o notável desempenho deles em muitos modelos de animais com câncer ainda precisa ser elucidado. Uma possibilidade é que eles inibem a ativação de procarcinogênicos que podem envolver reações de oxidação (GERSTER, 1993).

### 2.3.2 . Extrato do urucum

O urucueiro (*Bixa orellana* L.) é cultivado em quase todos os estados brasileiros e, principalmente, nos estados da Paraíba, Pará, Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Piauí e Paraná. Estima-se a produção brasileira em 12.000 toneladas de grãos anuais. Cerca de 60% dessa produção destina-se à fabricação de colorau (colorífico) e o restante é fornecido às indústrias de corantes e, ou, exportação. A fabricação do colorau é feita desde condições caseiras até agroindústrias de porte. O maior consumo deste condimento ocorre pelas populações nordestinas. As indústrias de corantes, denominados bixina/norbixina/norbixato, exportam ou comercializam, no mercado interno, os corantes em diferentes concentrações para as indústrias alimentícias (principalmente laticínios, salsicharias, massas, etc.), cosméticas e farmacêuticas. O mercado de colorau, estimado em 20 a 25 mil toneladas/ano, movimenta cerca de US\$ 12,0 milhões anuais, enquanto o de corantes cerca de US\$ 4,8 milhões e o pó e grãos em torno de US\$ 1,4 milhões (SÃO JOSÉ, 1998).

O urucum pode ser conhecido por vários nomes, dentre eles, Annatto, Terra Orellana, Bixa Orellana, Roucou e Achiote.

A partir das sementes de urucum, podem-se obter vários tipos de corantes diferentes entre si na solubilidade e pigmentação. Dentre esses corantes, podem-se citar a bixina, norbixina, sal da norbixina e os produtos de degradação térmica da bixina.

Segundo TAKAHASHI (1987) extratos de urucum são os produtos oleosos ou alcalinos obtidos por remoção da camada externa das sementes da árvore de urucum por vários processos. Estes extratos apresentam-se em forma de pós, pastas, suspensões ou soluções. Os extratos de urucum lipossolúveis são preparados por extração da camada externa das sementes por:

- remoção direta com óleos e ou gorduras comestíveis; e
- incorporação em óleos e ou gorduras comestíveis, do extrato obtido com solventes orgânicos (acetona, diclorometano, etanol, hexano, metanol, isopropanol, tricloroetileno), após remoção desses solventes.

Talvez o que torna o urucum uma das matérias primas mais interessantes para a extração de corantes seja a possibilidade de se obter, de

um mesmo tipo de semente, corantes solúveis em água (hidrossolúveis) e corantes solúveis em óleo (lipossolúveis), apenas alterando o solvente de extração.

A bixina é o pigmento natural da semente de urucum, representando 80% de todos os carotenóides presentes. A partir dela, são obtidos os demais pigmentos, como a norbixina (lipossolúvel), o sal da norbixina (hidrossolúvel) e produtos de degradação térmica que têm como características a lipossolubilidade e uma coloração amarela mais estável, ideal para o uso em massa.

O sal de norbixina (figura 5) é obtido pela extração alcalina (hidróxido de sódio ou de potássio) dos pigmentos da semente do urucum. Este tipo de extração converte a bixina em um sal (sal da norbixina), que nesta forma é solúvel em soluções aquosas alcalinas. O sal da norbixina é precipitado na forma de norbixina pela neutralização do pH da solução (pH=7), que nesta forma não é solúvel em água.

Além do sal de norbixina, é possível a solubilização da bixina e da norbixina em água com a utilização de emulsificantes como os polissorbatos, propileno glicol e outros. Essas emulsões são importantes na aplicação do pigmento em alimentos com pH baixo, o que torna inviável a utilização do sal da norbixina. Além disso, é possível obter, com o uso de emulsificantes, formulações solúveis tanto em água como em óleo.

Os principais aspectos tecnológicos que afetam o uso do sal da norbixina são a solubilidade, o pH, a estabilidade e a propriedade que este pigmento tem de se ligar à proteínas.

A hidrossolubilidade do sal de norbixina é limitada ao pH da solução, fazendo o seu uso restrito a produtos, cujo processo de aplicação do corante não exceda determinados limites. Todavia, este tipo de pigmento apresenta a característica única de se ligar à proteína, tornando-o altamente interessante para determinados tipos de produtos (CARVALHO, 1992).

A fórmula molecular da bixina é  $C_{25}H_{30}O_4$ , sendo sua massa molar igual a 394,50 g/mol. A fórmula molecular da norbixina é  $C_{24}H_{28}O_4$ , enquanto sua massa molar é 380,48 g/mol.

A bixina tem 20 carbonos em cadeia conjugada com um grupo carboxílico e um grupo metil éster terminais (figura 2). A isomerização nos

átomos de carbono 15-16 resultam nas formas trans e cis, chamados  $\beta$  e  $\alpha$ , respectivamente (ZECHMEISTER e ESWE, 1994).

Outros derivados da bixina, incluindo norbixina, têm um grupo carboxílico no final da estrutura com 20 carbonos conjugados; e metil bixina tem um grupo metil éster à cada terminal da cadeia.

O extrato de urucum lipossolúvel deve conter no mínimo 0,2% de carotenóides, expressos como bixina, enquanto o extrato de urucum hidrossolúvel deve conter no mínimo 0,2% de carotenóides, expressos como norbixina.

A fração lipossolúvel é insolúvel em água e pouco solúvel em etanol e a fração hidrossolúvel é solúvel em água e pouco solúvel em etanol.

Estes extratos produzem com o ácido sulfúrico concentrado coloração azul, devido à bixina; ou azul-esverdeado, devido à norbixina. O extrato lipossolúvel, diluídos com clorofórmio, dão absorvância máxima a 439, 470 e 501 nm. O extrato hidrossolúvel, diluído em água, dão absorvância máxima a 453 e 483nm.

Os extratos de urucum lipossolúveis devem trazer no rótulo o teor total de carotenóides expressos como % de bixina.

Os extratos de urucum hidrossolúveis devem trazer no rótulo o teor total de carotenóides expressos como % de norbixina.

Nos dois casos, deverão ser acrescentadas as substâncias adicionadas como veículo.

Aos extratos de urucum, não poderão ser atribuídas atividades de pró-vitamina A.

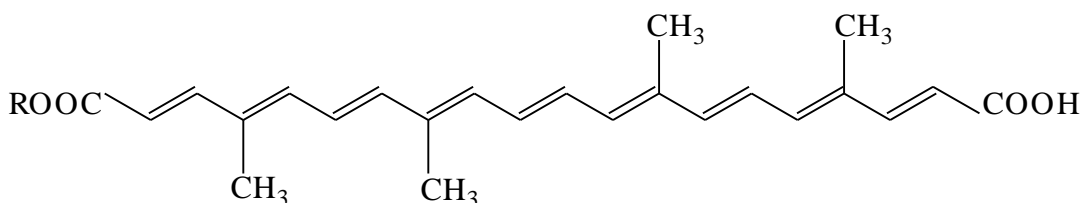


Figura 2 - Fórmula estrutural dos corantes naturais bixina (R = CH<sub>3</sub>) e norbixina (R = H).

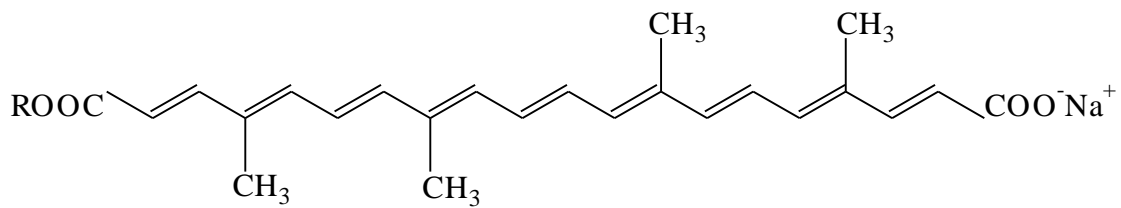


Figura 3 - Fórmula estrutural do sal de sódio da norbixina.

### 2.3.3 . Aplicações do corante do urucum

O corante de urucum é um aditivo largamente utilizado pela indústria de alimentos, graças à sua versatilidade de se obter pigmentos lipossolúveis, para melhorar a atratividade de produtos como manteiga, margarinas, óleo de milho, sobremesas, queijos, etc. Já os hidrossolúveis são aplicados em queijos, salsichas, sorvetes, derivados de cereais, confeites, bebidas e molhos (PIMENTEL, 1995; PRENTICE-HERNANDEZ, 1993 e TAKAHASIA e YABIKU, 1992).

Com a finalidade de investigar a recomendação popular do uso de urucum em problemas cardiovasculares, LUDUVING (1997) relata que após testes com cães, ratos e coelhos, comprovou-se a eficiência da água do urucum obtida por maceração das sementes (composto por mais de 80% de bixina como pigmento), na redução significativa dos índices de colesterol. Em testes clínicos, os resultados se confirmaram num tempo de 10 dias de consumo, ao invés de 15 dias previstos inicialmente, pois haviam pacientes com níveis de gordura sangüíneas abaixo do normal. Credita-se aos resultados que esse pigmento tenha o poder de acelerar o metabolismo das gorduras, sendo o responsável pela redução das taxas de triacilgliceróis e colesterol que, por algum mecanismo, só abaixa a fração ruim deste último.

## 2.4 . Constituintes sangüíneos

### 2.4.1 . Uréia

No homem e nos mamíferos em geral, a uréia é o principal produto do metabolismo protéico; é responsável por 80% do azoto não protéico excretado na urina, em condições normais. Sua taxa é mais elevada no soro e no plasma do que no sangue total. São mais fiéis os resultados quando a dosagem é feita no soro (ou plasma), porque não é afetada pelas eventuais variações do hematócrito.

A taxa de uréia no sangue varia em indivíduos normais entre 20 a 40 mg/dL, na grande maioria dos casos, embora possa existir até 50 mg/dL sem explicação patológica evidente.

A uréia é formada no fígado a partir dos ácidos aminados e do íon amônio, sendo este derivado, em grande parte, da ação bacteriana no intestino grosso. O grupo  $\text{NH}_2$  dos aminoácidos, que não é utilizado pelo organismo é transformado em uréia.

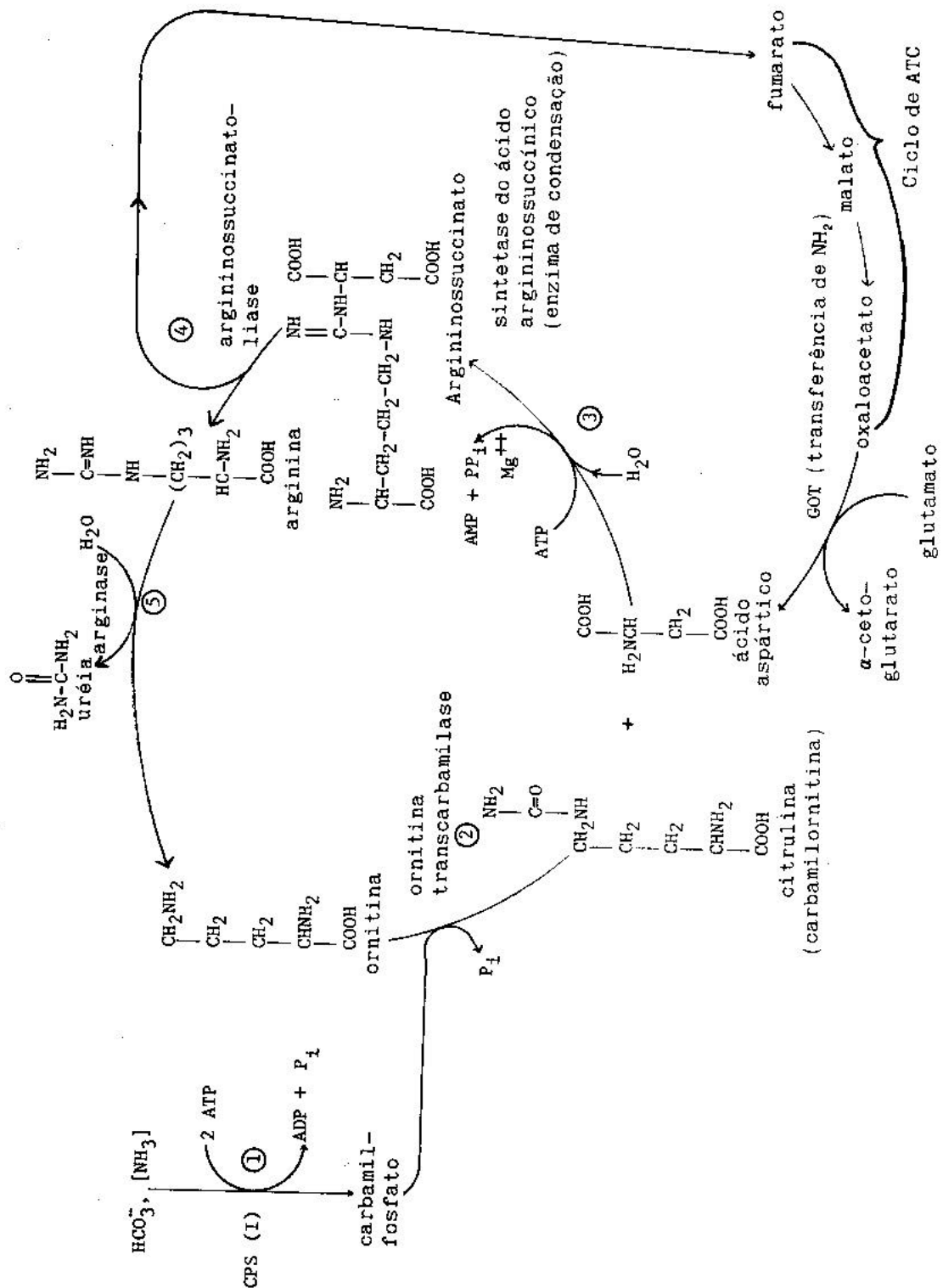
O aumento do teor de uréia no sangue pode ser devido: redução da eliminação renal, aumento do catabolismo protéico, combinação destes dois mecanismos.

As suas elevações na corrente sangüínea ocorrem em choque traumático, choque hemorrágico, desidratação aguda ou perda de eletrólitos (acidose diabética, doença de Addison, disenteria aguda), descompensação cardíaca, infecção aguda e toxemia, catabolismo protéico aumentado (febre, queimaduras), glomerulite, nefrosclerose, hemoglobinúria, tumores compressivos da bexiga, defeitos congênitos da bexiga ou da uretra, etc.

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 com sua excreção urinária.

Pelo ciclo da uréia (figura 4), um dos átomos de nitrogênio da uréia sintetizada por essa via é transferido de um aminoácido: o aspartato. O outro átomo de nitrogênio e o átomo de carbono são derivados de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{CO}_2$ . A

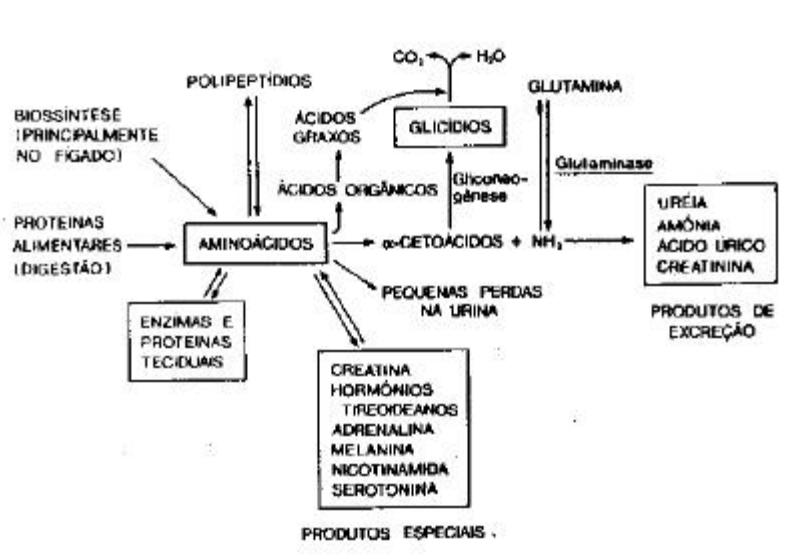
ornitina é o carreador desses átomos de carbono e nitrogênio. O precursor imediato da uréia é a arginina, que é hidrolisada a uréia e ornitina pela arginase. As outras reações do ciclo de uréia levam à síntese da arginina a partir da ornitina. Primeiro, um grupo carbamila é transferido à ornitina para 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 a 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 subsequência hidrólise de pirofosfato. Finalmente, a arginossuccinase cliva o argininossuccinato em arginina e fumarato. Essas reações, que transfere a amina do aspartato para formar arginina, preservam o esqueleto carbonado do aspartato, na forma de fumarato (STRYER, 1996).



Fonte: BHAGAVAN, 1977.

Figura 4 - Reações e estruturas do ciclo da síntese da uréia.

No fígado, o esqueleto carbonado dos aminoácidos é utilizado para a síntese de glicogênio (gliconeogênese) e a amônia resultante das desaminações e da atividade da glutaminase sobre a glutamina é utilizada para a síntese da uréia (figura 5). Muitos aminoácidos, por sua vez, são drenados para vias metabólicas especiais e em diversos casos formam-se produtos especiais em órgãos especializados (adrenalina, nor-adrenalina, tiroxina e melanina a partir de tirosina; serotonina, a partir de triptofano) (Bacila, 1980).



Fonte: BACILA, 1980.

Figura 5 - Processos gerais do metabolismo nitrogenado.

### 2.4.2 . Creatinina

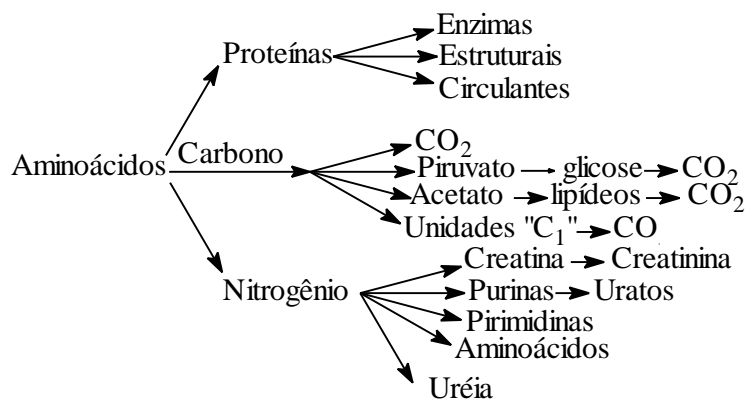
A creatinina é o elemento nitrogenado do sangue menos variável, no qual oscila normalmente de 1 a 2 mg/dL. É a forma amida da creatina, formado através da creatinofosfato no músculo. É eliminada pelos rins em quantidades singulares constantes, através da filtração glomerular e secreção tubular ativa. Sua taxa independe da ingestão das proteínas da alimentação e não é afetada pelo volume urinário.

A reação de Jaffé, na qual se baseia a maioria dos métodos de dosagem, não é específica para a creatinina, mas este fato não afeta o valor clínico desta determinação como índice da função renal.

A elevação do teor de creatinina no sangue se dá na insuficiência renal, quando a taxa de uréia já se encontra aumentada. Na nefrite incipiente, registram-se valores entre 2 e 4 mg/dL; na glomerulonefrite crônica, com uremia, as taxas se elevam até 35 mg/dL, o que prognostica desfecho letal próximo. As taxas acima de 5 mg/dL evidenciam pronunciada insuficiência renal. A dosagem da creatinina é de grande valor no seguimento de rins transplantados. Nas obstruções urinárias, por afecção da próstata, bexiga ou uréter, bem como na oligúria reflexa provocada pela nefrolitíase, verificam-se índices muito elevados, mas reversíveis pela remoção da causa da obstrução. A avaliação da função renal se faz, entre outros métodos, também pela prova de depuração da creatinina endógena. Substâncias tais como uréia, creatinina e ácido úrico são transportadas pelo sangue e eliminadas pelos rins. Sendo o rim o principal órgão excretor destas substâncias, há um interesse em dosá-las para investigar a função renal. Quando a função renal está prejudicada ou em déficit, estas substâncias se acumulam na circulação, tanto mais grave o comprometimento renal. A dosagem destas substâncias tem, portanto, valor diagnóstico e prognóstico.

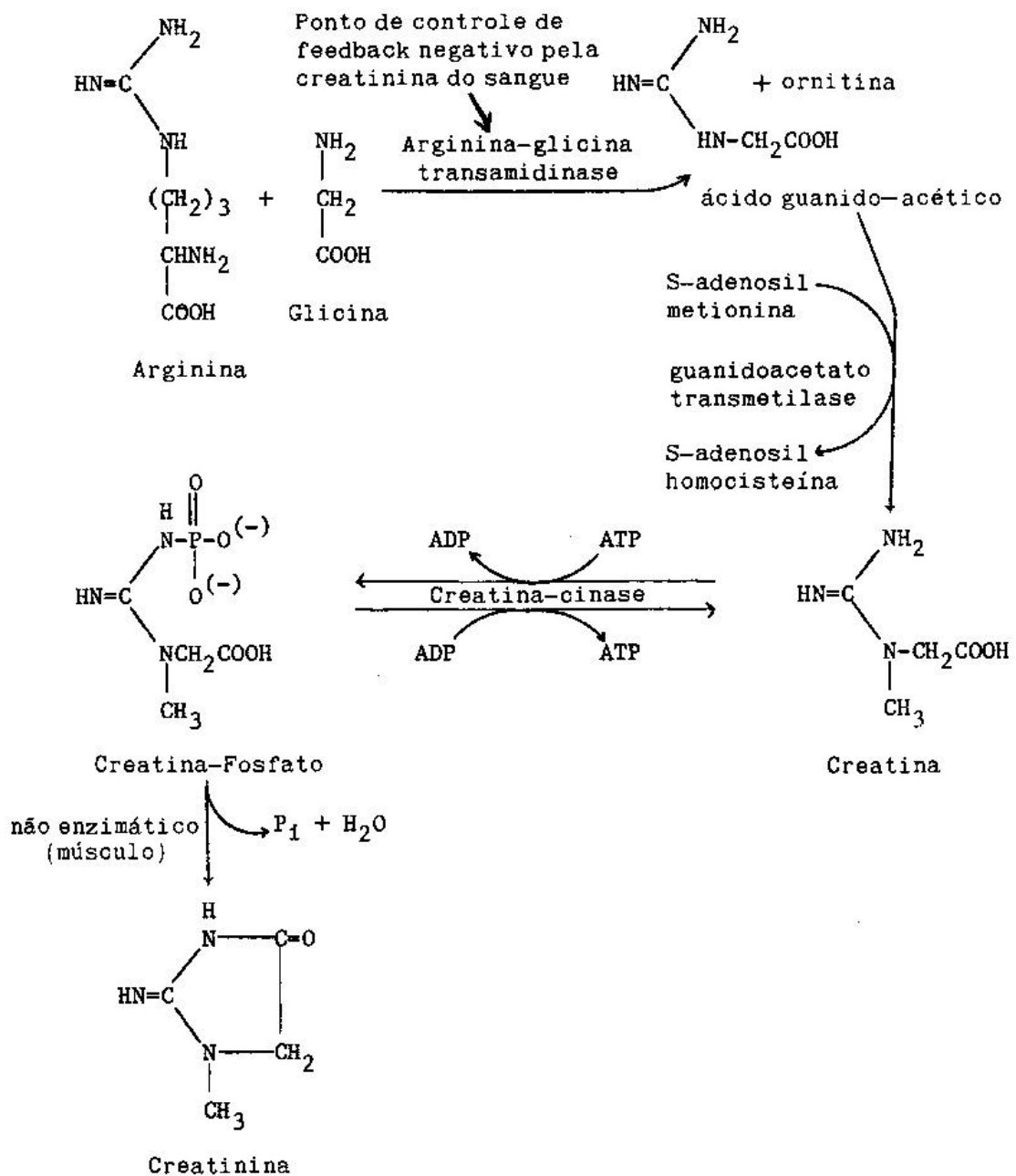
A creatinina é derivada da creatina, que foi formada por sua vez pelo nitrogênio proveniente do metabolismo de aminoácidos no fígado, segundo o esquema da figura 6.

A síntese da creatina, creatina-fosfato e creatinina estão ligados entre si e é mostrada na figura 7.



Fonte: VIEIRA et al.,1995.

Figura 6 - Metabolismo de aminoácidos no fígado.



Fonte: BHAGAVAN, 1977.

Figura 7 - S\u00edntese da creatina, creatina-fosfato e creatinina.

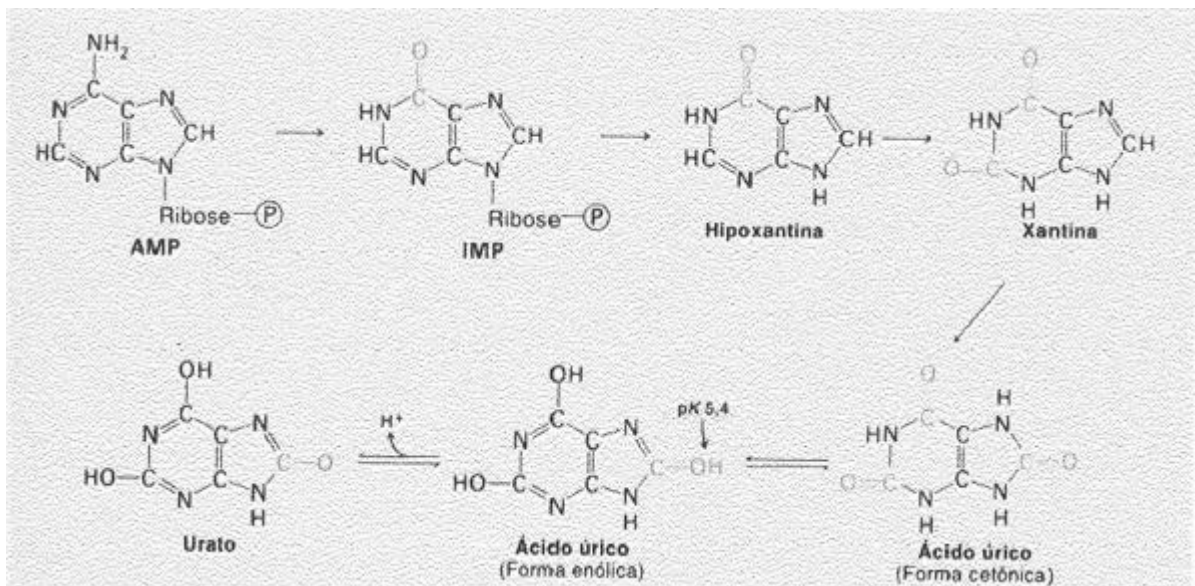
### 2.4.3 . Ácido Úrico

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 são um pouco superiores. O ácido úrico é o principal produto final do metabolismo das purinas no homem. O aumento da uricemia pode ocorrer por redução da excreção renal ou pelo excesso de produção. Os valores aumentados são observados em todas as formas de insuficiência renal com azotemia e podem, muitas vezes, preceder o aumento da uréia sangüínea, atingindo níveis de até 15 mg/dL, na obstrução do trato renal (adenoma da próstata, litíase uretral bilateral), nas lesões renais (pielonefrites, hidronefrose, rim policístico), na hipogenesia dos rins, na insuficiência cardíaca congestiva e na tuberculose. A hiperuricemia pode ocorrer na eclâmpsia, mesmo sem retenção simultânea da uréia, dado importante na diferenciação da eclâmpsia e da glomerulonefrite. O ácido úrico se eleva em várias manifestações hematológicas (leucemia, policitemia, drepanocitose, talassemia, anemia hemolítica), no mieloma múltiplo, no saturnismo, na vigência de radioterapia em processos neoplásicos, em transtornos neurológicos e mentais, espasticidade (especialmente em crianças), na síndrome de Down, no hipotireoidismo, na hipertensão, na quimioterapia dos tumores malignos, na psoríase, no jejum prolongado, no hiperparatireoidismo.

Na gota, que é um distúrbio do metabolismo purínico e que ocorre predominantemente no sexo masculino, os índices se situam acima de 10 mg/dL devido à produção excessiva do ácido úrico e simultaneamente à redução da excreção através dos rins. A hiperuricemia nesta afecção pode ser intermitente, de modo que uma dosagem normal não é dado suficiente para afastar o diagnóstico. A hiperuricemia é pouco freqüente e de significado clínico limitado. Ocorre na xantinúria hereditária, condição benigna e rara, nos defeitos tubulares (doença de Wilson e síndrome de Fanconi).

A formação do ácido úrico se dá pela degradação das purinas (figura 9). Os nucleotídeos são degradados a nucleosídeos pela hidrólise por nucleotidases. A clivagem fosforolítica de nucleosídeo à bases livres e ribose 1-fosfato (ou desoxirribose 1-fosfato), é catalisada por nucleosídeo fosforilases. Algumas das bases são reutilizadas, formando nucleotídeos por vias de

recuperação. A via de degradação de purinas (AMP (figura 8), por exemplo) inclui mais uma etapa. AMP é desaminado a IMP pela adenilato desaminase. O fosfato 5' do IMP é removido por hidrólise, e a ligação glicosídica é, então, cindida por  $P_i$  gerando hipoxantina, a base livre. A xantina oxidase, uma flavoproteína que contém molibidênio e ferro, oxida a hipoxantina a xantina, e, daí, ácido úrico. O oxigênio molecular, o oxidante em ambas as reações, é reduzido a  $H_2O_2$ , que é decomposta a  $H_2O$  e  $O_2$  pela catalase. A forma cetônica do ácido úrico está em equilíbrio com a forma enólica, que perde um próton em pH fisiológico, formando urato. Nos seres humanos, o urato é o produto final da degradação de purinas, e é excretado na urina (STRYER, 1996).



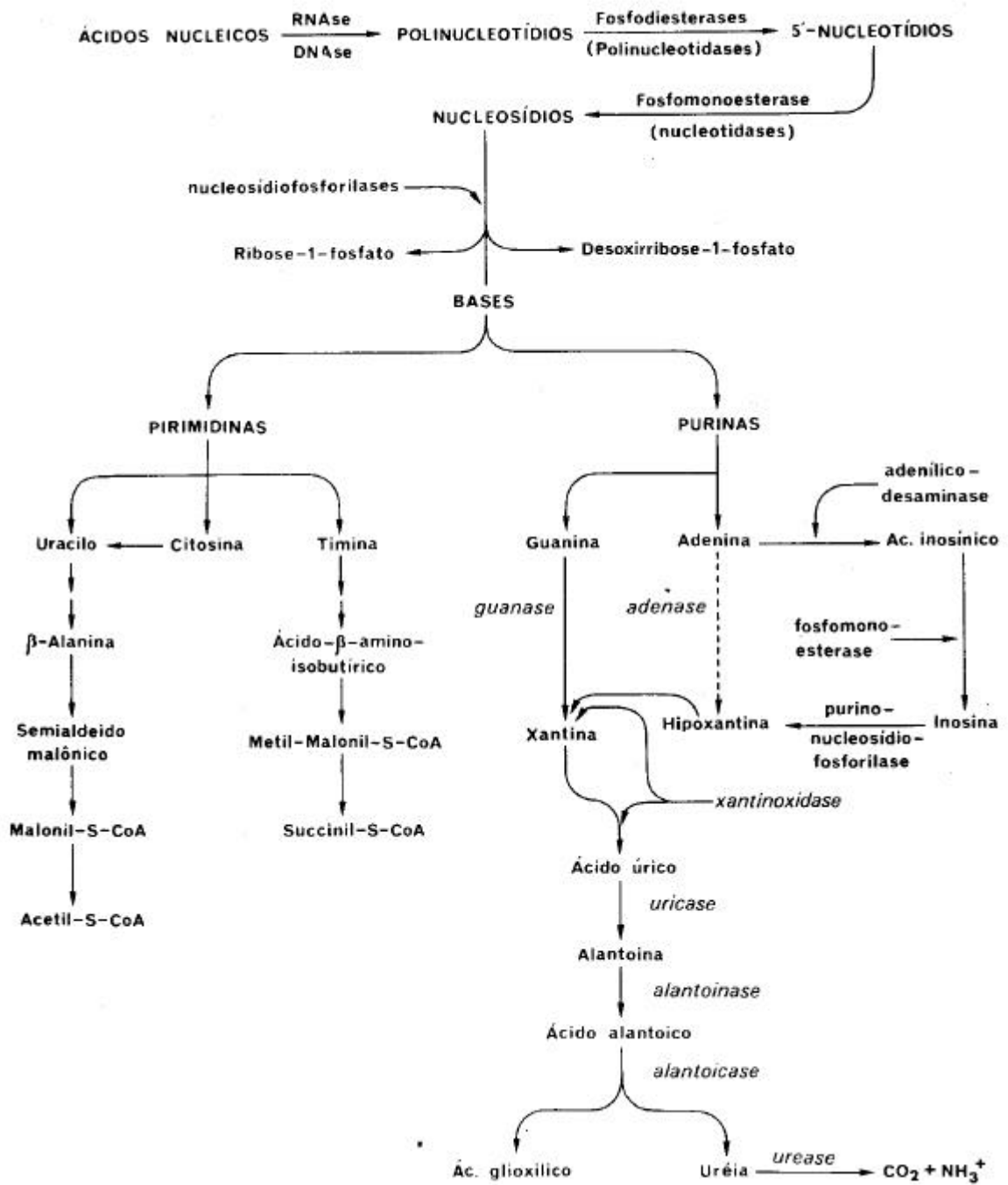
Fonte: STRYER, 1996.

Figura 8 - Degradação de AMP a ácido úrico.

A partir da xantina, a extensão do catabolismo purínico é distinta nos animais: nas aves, nos répteis terrestres, nos macacos superiores e no cão dalmata, termina no ácido úrico; nos demais mamíferos e no coelho termina na alantoína; em alguns teleósteos prossegue até o ácido alantóico; e nos seláceos, nos dipnóides e em outros teleósteos vai até ácido glicóxico e uréia.

Em invertebrados, o uricotelismo experimenta diversificação semelhante à dos vertebrados (BACILA, 1980).

Um fato interessante é que níveis altos de urato no soro humano, que ocorrem em indivíduos propensos a ter gota, pode ter uma ação pronunciadamente benéfica. O urato é um coletor muito eficiente de espécies químicas muito reativas e prejudiciais do oxigênio, a saber, radicais hidroxila, anionte superóxido, singleto de oxigênio, e intermediários oxigenados do hemo com altos estados de valência do Fe (+4, +5), sendo quase tão eficiente quanto o ascorbato, agindo como antioxidante. O nível alto de urato em seres humanos pode contribuir significativamente para o maior tempo de vida e para a menor incidência de câncer humano (STRYER, 1996).



Fonte: BACILA, 1980.

Figura 9 - Degradação de bases pirimídicas e purínicas.

#### 2.4.4 . Colesterol

O colesterol provém da dieta e da síntese pelo organismo. A dieta balanceada contém de 300 a 600 mg/dia, cerca da metade origina-se dos ovos e o restante dos laticínios e da gordura animal. Ele é precursor dos ácidos biliares e dos hormônios esteróidais.

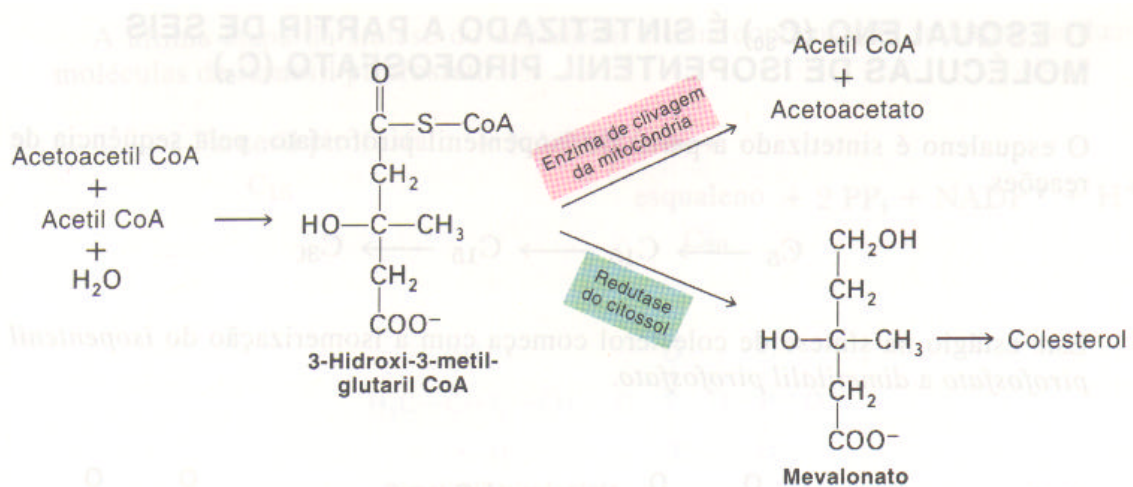
O colesterol total no sangue varia entre 150 e 250 mg/dL. É formado por duas frações, o colesterol livre e o esterificado (este, combinado com ácidos graxos), representando respectivamente, 20 a 40% e 60 a 80% do total. A relação entre as duas frações se mantém constante, a despeito das amplas variações da colesterolemia que podem ocorrer em estados patológicos, exceto em moléstias do fígado, nas quais a redução da parte esterificada é proporcional à gravidade da lesão parenquimatosa, podendo atingir 20-30% do total.

A hipercolesterolemia ocorre no diabetes com taxas de até 3.600 mg/dL, na síndrome nefrótica com valores de 500 e 700 mg/dL podendo chegar até 2200 mg/dL. Na glomerulonefrite, a colesterolemia geralmente se acha dentro dos limites da normalidade. No hipotireoidismo, a hipercolesterolemia é constante, estando em relação proporcional com a redução do metabolismo basal. As moléstias do trato biliar, como icterícia, são acompanhadas de hipercolesterolemia, não havendo comprometimento do parênquima hepático. Na anestesia pelo éter têm sido assinaladas taxas elevadas de colesterol durante e após o ato cirúrgico. Na aterosclerose pode ocorrer hipercolesterolemia e, ou, hiperlipidemia. O nível de colesterol e, ou, dos lipídeos totais pode conferir significação prognóstica quanto ao risco de acidente vascular.

A hipercolesterolemia é verificada com freqüência também nas xantomatoses, xantelasma, xantoma diabético, xantoma tuberoso, na hiperlipidemia idiopática familiar, na osteoartrite hipertrófica, na catarata senil e na psoríase.

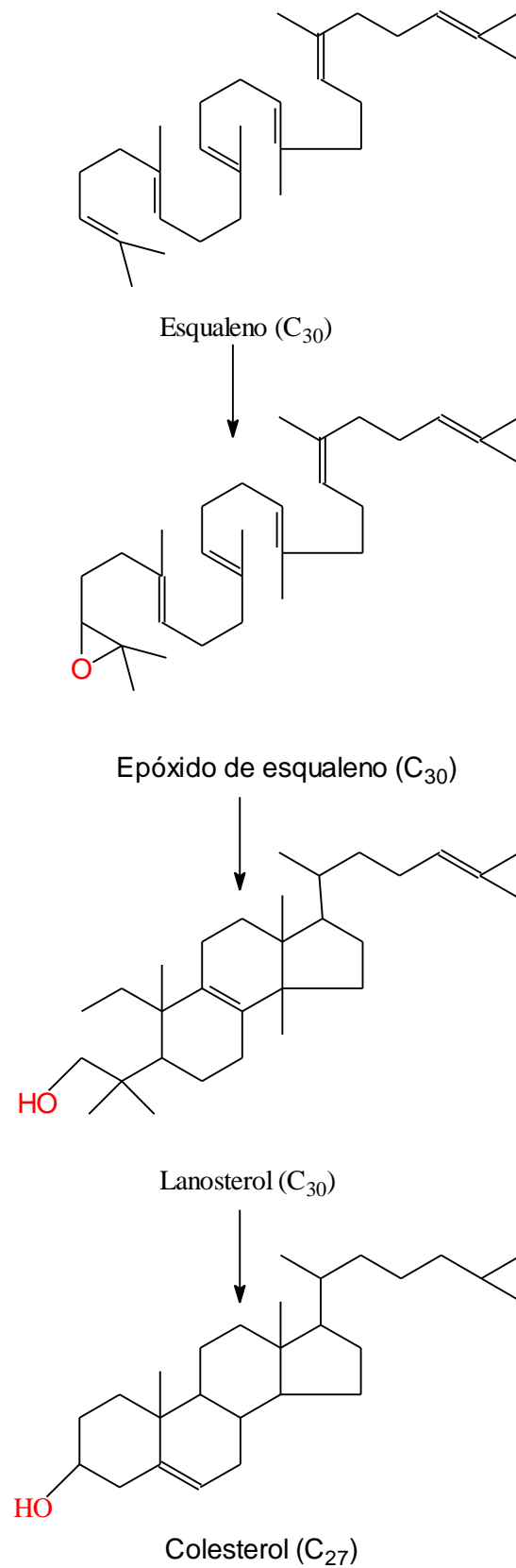
O colesterol é formado a partir de acetil CoA. A etapa principal de sua síntese é a formação de mevalonato a partir de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (derivado de acetil CoA e acetoacetil CoA) (figura 10). O mevalonato é convertido a isopentenil pirofosfato (C<sub>5</sub>), que se condensa com seu isômero, dimetilalil pirofosfato (C<sub>5</sub>), para formar geranyl pirofosfato (C<sub>10</sub>). A adição de uma

segunda molécula de isopentenil pirofosfato fornece farnesil pirofosfato (C<sub>15</sub>), que se condensa consigo mesmo para formar esqualeno (C<sub>30</sub>), que é modificado a fim de fornecer colesterol (C<sub>27</sub>) (figura 11). A síntese de colesterol pelo fígado é regulada por variações na quantidade e na atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase. A transcrição do gene, a tradução do mRNA e a degradação da proteína são rigorosamente controladas. Adicionalmente, a atividade da redutase é regulada por fosforilação (STRYER, 1996).



Fonte: STRYER, 1996.

Figura 10 - Síntese e destinos da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA.



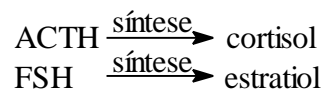
Fonte: STRYER, 1996.

Figura 11 - Síntese do colesterol a partir do esqualeno.

### 2.4.5 . Colesterol-HDL

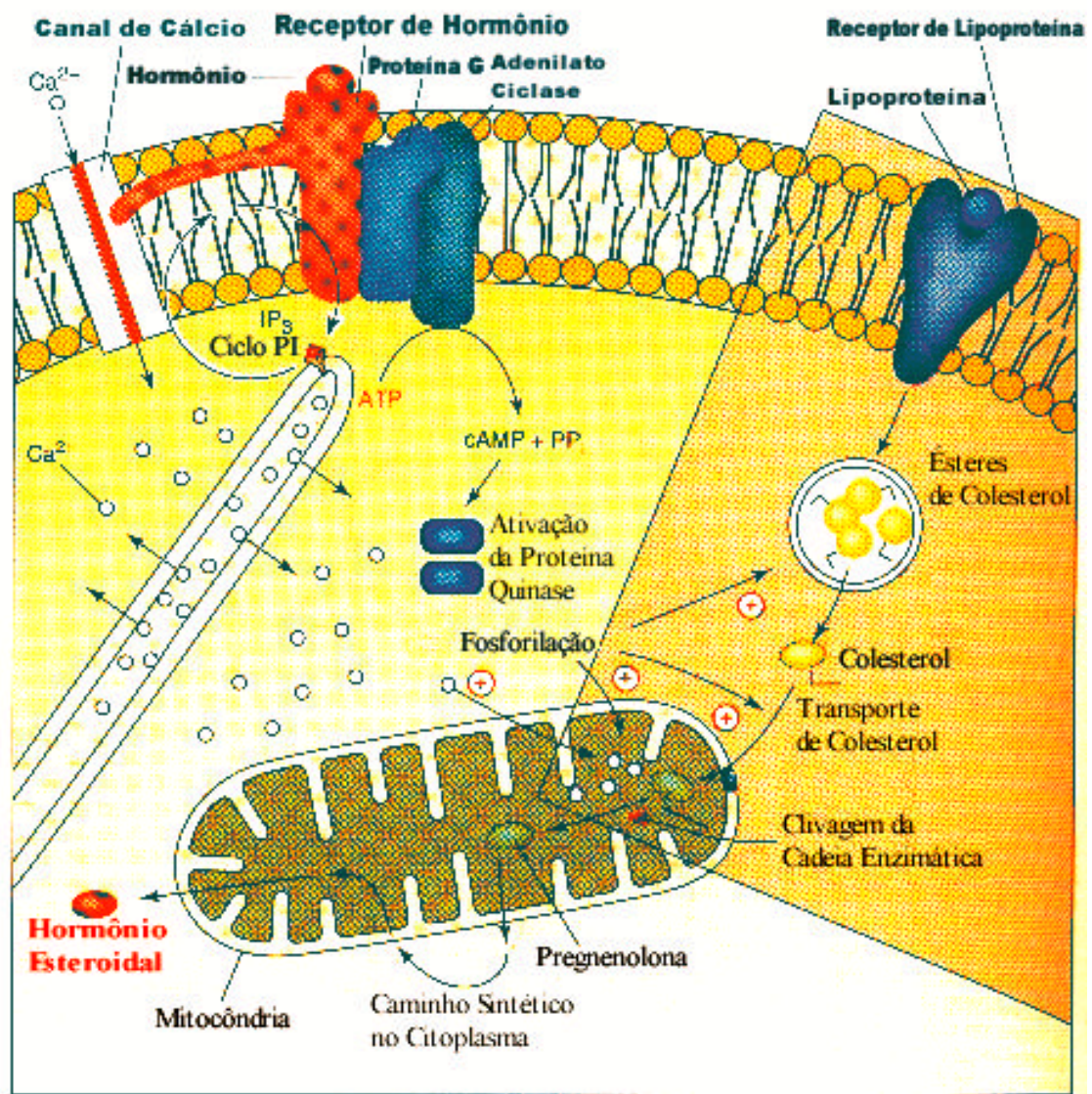
Os indivíduos com colesterol-HDL elevado correm menor risco de doenças coronarianas, em contrapartida, aqueles níveis baixos são mais sujeitos a acometimentos das coronárias. Isto porque o colesterol-HDL transporta o colesterol da circulação para o fígado, onde é metabolizado. Os valores normais do colesterol-HDL são nos homens de 30 a 40 mg/dL, nas mulheres de 40 a 50 mg/dL. O consumo moderado de álcool parece aumentar o nível de HDL-c em indivíduos de vida sedentária.

Nas células, as lipoproteínas, como o colesterol-LDL e o colesterol-HDL, participam da síntese de hormônios esteroidais que são obtidos a partir do colesterol, de acordo com as figuras 12. Um hormônio ACTH e FSH (hormônio folículo estimulante), por exemplo, se liga a um receptor hormonal



e ocorre a ligação do receptor hormonal, com a proteína G e enzima adenilato ciclase, que podem estar diretamente relacionadas com o canal de  $\text{Ca}^{+2}$ .

A adenilato ciclase é ativada e ativa o ATP, que se transforma em AMP cíclico. O AMP cíclico por sua vez ativa a proteína quinase e esta provoca a fosforilação de proteínas. As proteínas fosforiladas atuam como moduladores positivo e hidrolizam o éster de colesterol à colesterol em seu transporte para o interior da mitocôndria. O éster de colesterol é obtido de lipoproteínas. A lipoproteína que mais contém éster de colesterol é o LDL, contendo 1.500 moléculas do éster, contra 500 de colesterol. Esta lipoproteína pode se ligar à receptores de LDL e é transportada para o interior da célula. As proteínas fosforiladas modulam positivamente, no citoplasma, a hidrólise dos ésteres de colesterol e o transporte destes para o interior da mitocôndria. Nesta organela, são sintetizadas a pregnenolona e outros hormônios esteroidais.



Fonte: DEVLIN, 1997.

Figura 12 - Esquema de reações de síntese de hormônios esteroidais.

## 2.4.6 . Triacilgliceróis

A taxa normal de triacilgliceróis no soro varia, em pessoas normais, entre 50 a 150 mg/dL, sendo um pouco mais baixa nas mulheres. Vários fatores podem alterar estes valores independente da patologia.

A taxa de triacilgliceróis está elevada na diabete, na síndrome nefrótica, na pancreatite, na hiperlipidemia essencial, na aterosclerose e nas doenças coronarianas.

## 2.4.7 . Transaminases

As transaminases transferem o grupo  $\text{NH}_2$  dos aminoácidos para cetoácidos.

As duas transaminases de grande importância clínica são a transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) (BHAGAVAN, 1977).

A transaminase glutâmica-oxaloacética catalisa a reação: ácido oxaloacético + ácido glutâmico, produzindo ácido alfa-cetoglutárico + ácido aspártico. A transaminase glutâmico-pirúvica agora denominada alanina aminotransferase catalisa a reação: ácido pirúvico + ácido glutâmico, produzindo alanina + ácido alfa-cetoglutárico (Figura 13).

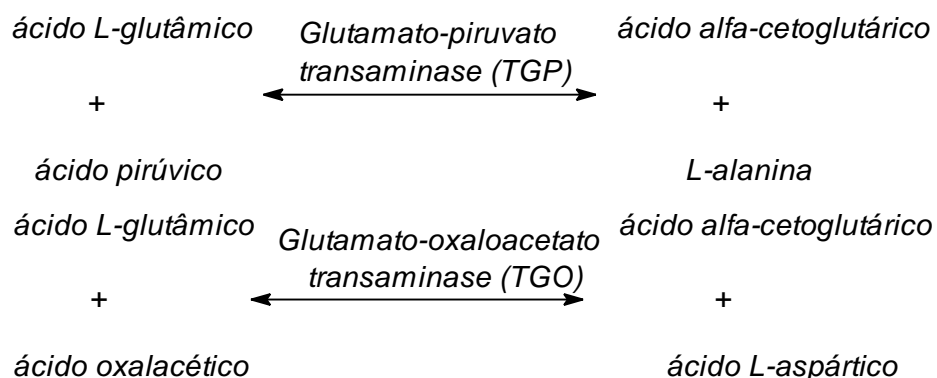


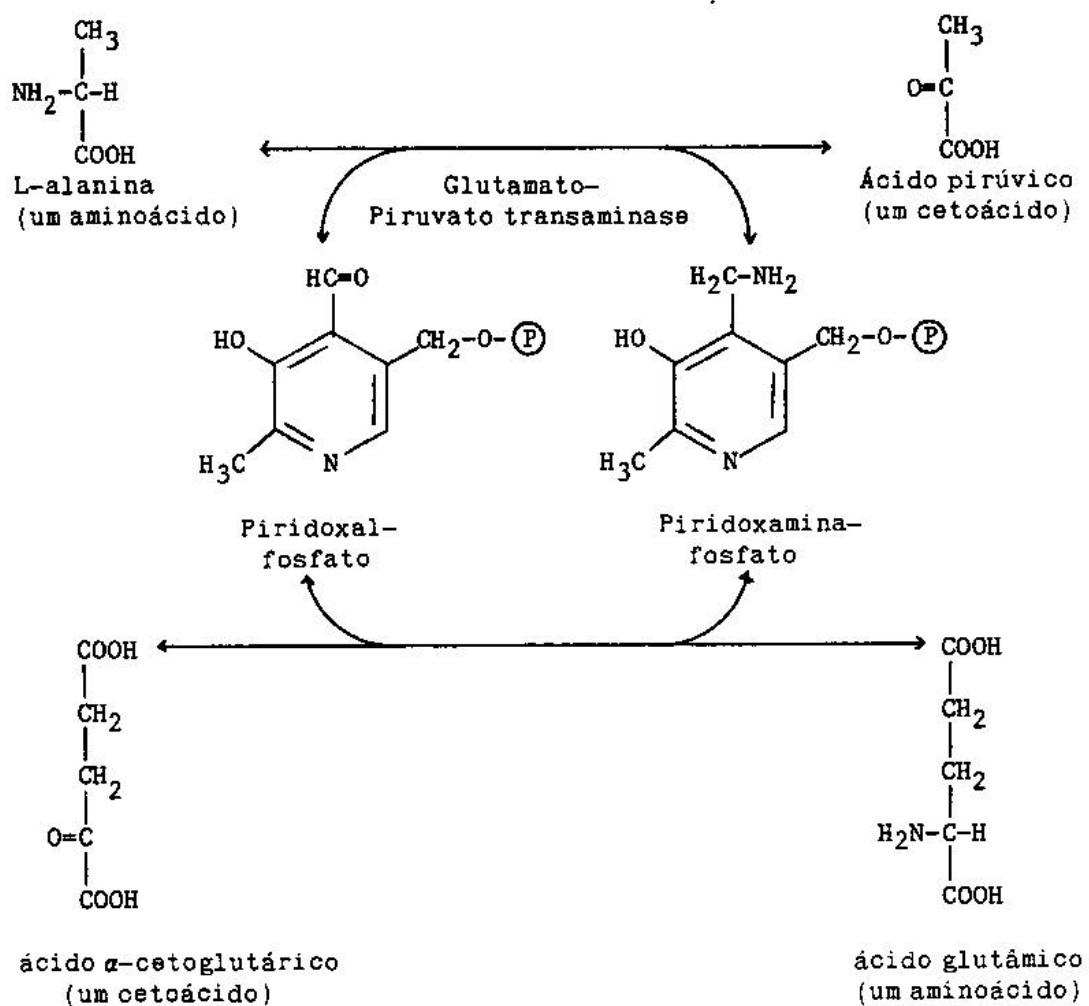
Figura 13 - Transaminação de aminoácidos

Todas as reações de transaminação parecem ter o mesmo mecanismo e empregam a mesma coenzima (piridoxal-fosfato), um derivado da vitamina B<sub>6</sub> importante em muitas reações envolvendo  $\alpha$ -aminoácidos. O piridoxal-fosfato serve como um carreador de amino-grupos dos aminoácidos. A coenzima é transformada reversivelmente de sua forma aldeído livre, piridoxal-fosfato, para a sua forma aminada (figura 14) (BHAGAVAN, 1977).

Uma unidade de transaminase corresponde à quantidade de 1 micrograma de ácido pirúvico ou de ácido oxaloacético formado, respectivamente, pelas enzimas TGO e TGP, em condições padronizadas. A unidade internacional é a quantidade de enzima que transforma um micromol por minuto a 25<sup>o</sup>C.

Os valores normais das transaminases no soro oscilam entre 5 e 20 U/mL para a glutâmico-oxaloacético (aspartato-aminotransferase) e 5 e 15 U/mL para a glutâmico-pirúvico.

Segundo pesquisadores a determinação da transaminase glutâmico oxaloacética fornece elemento de grande significação diagnóstica nas seguintes situações: na diferenciação entre enfarte do miocárdio e insuficiência coronariana, no diagnóstico do enfarte do miocárdio quando as alterações do ecocardiograma não são bem definidas, na avaliação da extensão do enfarte. O aumento da TGO tem sido assinalado também na anemia aguda, na necrose renal, no cateterismo cardíaco.



Fonte: BHAGAVAN, 1977.

Figura 14 - Papel do piridoxal-fosfato na conversão de um  $\alpha$ -aminoácido para um  $\alpha$ -cetoácido, e ao mesmo tempo um  $\alpha$ -cetoácido para um  $\alpha$ -aminoácido.

Devido ao fato de serem enzimas intracelulares, em geral os níveis séricos de TGO e TGP são muito baixos. Qualquer destruição significativa do tecido dá origem a níveis elevados de transaminase sérica. Por exemplo, no infarto do miocárdio, há um aumento no nível sérico de TGO (o músculo cardíaco contém altas concentrações desta enzima). Há alterações dos níveis séricos de TGO e TGP em algumas doenças hepáticas (hepatite infecciosa, mononucleose infecciosa). Também foram encontrados altos níveis séricos desta enzima nas condições onde há lesão do músculo esquelético. Quando essas enzimas são medidas no soro, os valores obtidos são conhecidos como atividades de STGO e STGP (onde o S se refere a soro) (BHAGAVAN, 1977).

#### **2.4.8 . Cálcio**

O cálcio é o mineral mais abundante no organismo. Constitui cerca de 1,5 a 2% do peso corpóreo. Embora mais de 98 por cento dos 1 a 2 Kg de cálcio do organismo estejam localizados no esqueleto, o restante desempenha numerosas funções não relacionadas à estrutura óssea. A concentração de  $Ca^{+2}$  no líquido intracelular é de cerca de 0,2g/kg de tecido, enquanto varia de 8,8 a 10,4 mg/dL no sangue. O fluxo de  $Ca^{+2}$  entre os líquidos extracelular e intracelular, através das membranas celulares específicas e membranas de organelas intracelulares, é regulado por dois hormônios – o *hormônio paratireóideo* e a *calcitonina* -, bem como pelo *1,25 diidroxicolecalciferol*, um produto do metabolismo da vitamina D (SMITH e BANKS, 1986).

Dentre as funções mais importantes do  $Ca^{+2}$ , destacam-se a necessidade do íon na atividade de numerosos sistemas enzimáticos, incluindo os responsáveis pelas propriedades de contração muscular, a transmissão de impulsos nervosos, a resposta muscular à atividade neural, o mecanismo de coagulação sanguínea e a modulação da ação de vários hormônios, sendo necessário na transmissão nervosa e regulação dos batimentos cardíacos. Muitos desses 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 de coagulação sanguínea, estimula a liberação de tromboplastina das plaquetas de sangue (MAHAN,1995).

A análise deste mineral deve ser feita, pois está presente nas seguintes condições: hiperparatireoidismo, hipervitaminose D, neoplasias, fraturas ósseas, osteíte fibrosa cística, síndrome nefrótica, etc.

### **3 . MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 . Extração e determinação dos constituintes químicos do urucum**

Foram feitas as extrações e determinações dos constituintes presentes nas sementes do Urucum, denominados fruto verde piloso e fruto vermelho.

As sementes de urucum foram obtidas em cruzamentos genéticos entre espécies realizados nos campos experimentais da UFV por PINHEIRO e ALMEIDA, 1992.

Os extratos lipossolúveis de Urucum foram obtidos por extração direta da parte externa da semente com óleo de soja refinado (TAKAHASHI, 1987). Os extratos hidrossolúveis foram obtidos por extração com solução de hidróxido de sódio 0,01 N (TAKAHASHI, 1987).

Para as provas de identificação de bixina, foram realizados o teste de Carr-Price para os extratos lipossolúveis e hidrossolúveis (TAKAHASHI, 1987) além de testes de solubilidade, ponto de fusão, espectro no U.V, I.V, RMN e reações com ácido sulfúrico (TAKAHASHI, 1987).

A quantificação, nos extratos, foi realizada por espectrofotometria utilizando-se o método de Carr-Price (TAKAHASHI, 1987).

Os teores de carboidratos ácidos digeríveis (CAD), solúveis, totais e redutores foram determinados pelo método de Teles (TELES, 1977), os não

reduzidos por diferença, os de proteínas, gorduras, cinzas e umidade pelos métodos da A.O.A.C. (AOAC, 1984).

Os teores de cálcio, ferro, fósforo, manganês e cloretos foram dosados pelos métodos do Instituto Adolfo Lutz (PREGNOLATTO e PREGNOLATTO, 1985).

### **3.2 . Primeiro ensaio biológico de curta duração (44 horas de duração)**

Foram utilizados 36 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, com peso médio de  $2.500 \pm 200$ g e idade média de oito semanas.

Eles receberam a ração comercial Nutricoeelhos e água à vontade.

Os coelhos foram separados em seis grupos contendo seis animais em cada um, distribuídos ao acaso, que receberam as substâncias conforme descrito abaixo:

Grupo 1: Ração (grupo controle).

Grupo 2: Ração + Triton

Grupo 3: Ração + Triton + Bixina a 30%

Grupo 4: Ração + Triton + Bixina a 95%

Grupo 5: Ração + Triton + Luteolina

Grupo 6: Ração + Triton + Apigenina

A hiperlipidemia foi induzida, administrando-se por via intraperitoneal, Triton, na dose de 300 mg/kg de peso corporal, dissolvido em NaCl à 0,9%.

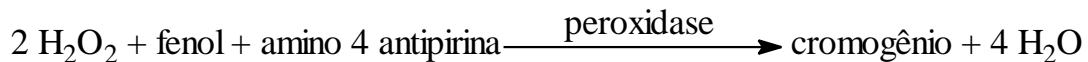
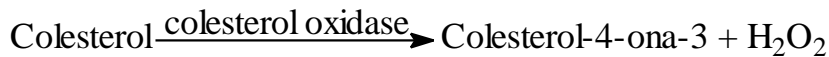
Após 20 horas da administração do Triton, foram fornecidas as substâncias em estudo na dose de 10 mmol/kg de peso corporal, por via intraperitoneal, utilizando-se o propileno glicol como veículo.

Decorridos 24 horas dessas administrações, foram coletados sangue dos animais, na veia marginal da orelha. Em seguida, foram centrifugadas à  $7100 \times G$ , durante 15 minutos, para obtenção do soro. As dosagens sorológicas foram efetuadas e os resultados expressos em mg/dL de Colesterol, Colesterol-HDL e Triacilgliceróis.

Para todas as dosagens sorológicas dos constituintes, utilizou-se o Kit Biolab.

### 3.2.1 . Determinação do colesterol

A análise colorimétrica do colesterol no soro obtido, baseou-se na transformação do colesterol esterificado em colesterol e ácido graxos, mediado pela colesterol esterase. O colesterol formado é oxidado pela colesterol oxidase em colesteno-4-ona-3, liberando água oxigenada. Esta, juntamente com o fenol e amino 4 antipirina, pela ação da peroxidase, são transformados no cromogênio (que absorve em 500 nm) e em água, segundo as equações:



Para a dosagem, foi utilizado o equipamento multiparamétrico de Bioquímica (Alizé). 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.

Após programado o equipamento, este promoveu a mistura da solução mencionada acima com os determinados soros, que foram incubados por um tempo programado à 37°C e analisados em um comprimento de onda de 500nm.

O aparelho subtraiu a absorvância encontrada do branco (solução tampão das enzimas com soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em mg/dL de colesterol no soro sangüíneo.

A fórmula geral para a conversão da absorvância na concentração em mg/dL foi a seguinte:

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

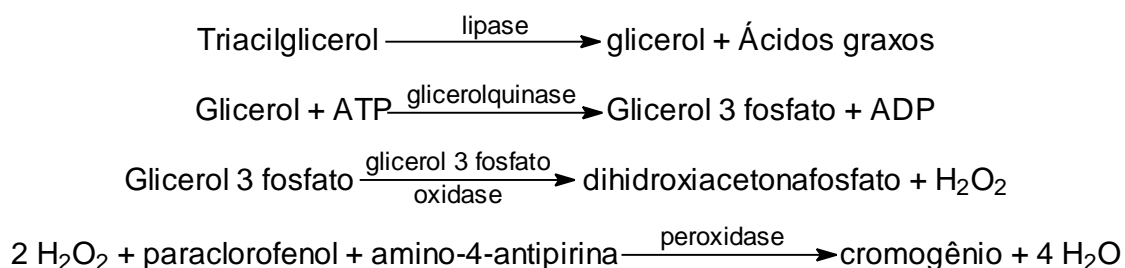
em que  $A = \text{absorvância}$

### 3.2.2 . Determinação do triacilglicerol

A dosagem dos triacilgliceróis séricos foi feita por via inteiramente enzimática.

A lipase degrada os triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos. O glicerol obtido reagiu com ATP, em presença da 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 505nm), liberando água.

As equações foram as seguintes:



Para a dosagem, foi utilizado o equipamento multiparamétrico de Bioquímica (Alizé). 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.

Após programado o equipamento, este promoveu a mistura da solução mencionada acima com os determinados soros, que foram incubados por um tempo programado à 37<sup>0</sup>C e analisados em um comprimento de onda de 505 nm.

O aparelho subtraiu a absorvância encontrada do branco (solução tampão das enzimas com soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em mg/dL de triacilglicerol no soro sangüíneo.

A fórmula geral para a conversão da absorvância na concentração em mg/dL foi a seguinte:

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

em que  $A = absorvância$

### 3.2.3 . Determinação do colesterol-HDL

O método de dosagem se baseou na precipitação dos quilomícrons e das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e de baixa densidade (LDL) contidos no soro a ser analisado, pela adição do ácido fosfotúngstico em presença do íon magnésio. O sobrenadante obtido por centrifugação contém as lipoproteínas de alta densidade (HDL), cujo colesterol é determinado pelo mesmo processo já descrito na Dosagem do colesterol.

### 3.3 . Segundo ensaio biológico com duração de 28 dias

Foram utilizados 48 coelhos da raça Nova Zelândia, com peso médio variando de  $1.550 \pm 100g$  e com idade de oito semanas a  $2.200 \pm 100$  após atingir doze semanas de idade.

Eles receberam a ração comercial Nutricoeelhos na proporção de 100 gramas diárias e água à vontade.

Os coelhos foram separados em 8 grupos contendo 6 animais em cada um, distribuídos ao acaso, recebendo as substâncias conforme descritas abaixo:

Grupo 1: Ração (grupo controle).

Grupo 2: Ração + Colesterol + Ácido cólico

Grupo 3: Ração + Colesterol + Ácido cólico + Bixina 95%

Grupo 4: Ração + Colesterol + Ácido cólico + Bixina 95% + Rutina

Grupo 5: Ração + Colesterol + Ácido cólico + Bixina 95% + Quercetina

Grupo 6: Ração + Colesterol + Ácido cólico + Rutina

Grupo 7: Ração + Colesterol + Ácido cólico + Quercetina

#### Grupo 8: Ração + Colesterol + Ácido cólico + Norbixina

A hiperlipidemia foi induzida, administrando-se, por via oral, Colesterol a 0,5% + Ácido cólico a 0,1% de peso da ração diária.

O Colesterol + Ácido cólico foram ministrados todos os dias, juntamente com a ração e as substâncias a serem testadas.

As substâncias em estudo foram fornecidas na dose de 10 mol/kg de peso corporal, por via oral, em cápsulas, utilizando o talco como veículo.

No tempo zero e após 28 dias com este tratamento, o sangue dos animais foram coletados. Em seguida, foram centrifugados a 7.100 x G, durante 15 minutos, para obtenção do soro. As dosagens sorológicas foram efetuadas e obtidos os resultados em mg/dL de Colesterol , Colesterol – HDL, Triacilgliceróis, Creatinina, Proteínas Totais, Cálcio, Uréia, Ácido Úrico, TGP e TGO.

As análises de colesterol, colesterol – HDL e triglicerídeo foram feitas do mesmo modo como descritas nas páginas 53,54 e 55. Os demais constituintes serão descritos nos testes de toxicidade aguda.

### **3.4 . Testes de toxicidade aguda**

A realização dos testes toxicológicos foi feita juntamente com o ensaio de 28 dias descrito anteriormente. O efeito toxicológico das substâncias foram testadas dosando-se, no soro sangüíneo, os constituintes químicos Colesterol, Colesterol-HDL, Triacilgliceróis, Creatinina, Proteínas Totais, Cálcio, Uréia, Ácido Úrico, TGP e TGO, presentes na circulação sangüínea dos coelhos.

#### **3.4.1 . Determinação da creatinina**

A determinação cinética da creatinina sem a desproteinização consistiu em medir o composto formado durante um minuto da reação entre a creatinina e o ácido pícrico, em meio alcalino. O composto formado por esta reação absorve em um comprimento de 492 nm.

Para a dosagem, foi utilizado o equipamento multiparamétrico de Bioquímica (Alizé). Foi colocado no equipamento uma solução alcalina contendo 0,4 mol/L de hidróxido de sódio com 50 mmol/L de fosfato de sódio, misturado com igual volume a uma solução 8,8 mmol/L de ácido pícrico e separadamente os soros sangüíneos a serem analisados.

Após programado o equipamento, este promoveu a mistura da solução mencionada acima com os determinados soros, que foram incubados por um tempo programado à 37<sup>0</sup>C e analisados em um comprimento de onda de 492nm.

O aparelho subtraiu a absorvância encontrada do branco (solução alcalina do ácido pícrico com soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em mg/dL de creatinina no soro sangüíneo.

A fórmula geral para a conversão da absorvância na concentração em mg/dL foi a seguinte:

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

em que  $A = absorvância$

### 3.4.2 . Determinação de proteínas totais

As proteínas totais do soro foram dosadas colorimetricamente pelo método do tipo Biureto, que consiste em complexar à proteína sais de cobre em meio alcalino, formando um complexo de coordenação entre o íon cúprico e quatro grupos NH das cadeias peptídicas, como esquematizado na figura 15.

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

Para a dosagem, foi utilizado o equipamento multiparamétrico de Bioquímica (Alizé). Foi colocado no equipamento uma solução alcalina de 245 mL contendo 0,2 mol/L de hidróxido de sódio, 5 g/L de iodeto de potássio e 9 g/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 sangüíneos a serem analisados.

Após programado o equipamento, este promoveu a mistura da solução mencionada acima com os determinados soros, que foram incubados por um tempo programado à 37°C e analisados em um comprimento de onda de 545nm.

O aparelho subtraiu a absorvância encontrada do branco (solução alcalina de sulfato de cobre com soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em mg/dL de proteínas totais do soro sanguíneo.

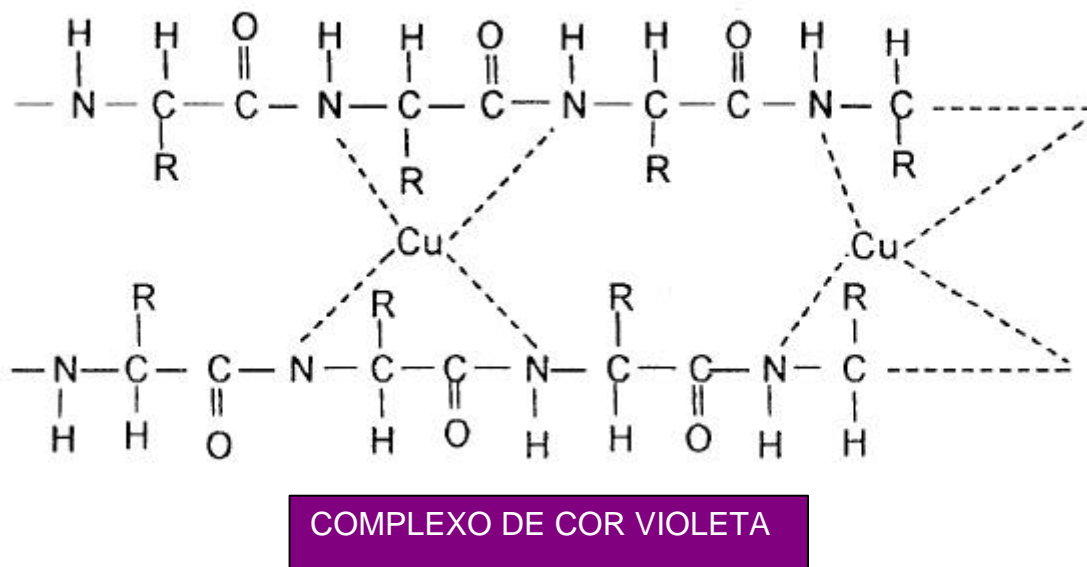


Figura 15 - Adição de íons cobre à proteína.

A fórmula geral para a conversão da absorvância na concentração em mg/dL foi a seguinte:

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

em que  $A = absorvância$

### 3.4.3 . Determinação do cálcio

A dosagem colorimétrica do cálcio “in vitro”, presente no soro sangüíneo dos coelhos, sem desproteïnização, é determinada pelo indicador azul de metiltimol. 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.

O comprimento de onda utilizado para a análise foi de 612nm.

Para a dosagem, foi utilizado o equipamento multiparamétrico de Bioquímica (Alizé). Foi colocado no equipamento separadamente, uma solução alcalina contendo 8 - hidroxiquinoleína, outra solução do indicador azul de metiltimol e soros sangüíneos a serem analisados.

Após programado o equipamento, este promoveu a mistura das soluções mencionadas acima e os determinados soros, que foram incubados por um tempo programado à 37<sup>0</sup>C e analisados em um comprimento de onda de 612 nm.

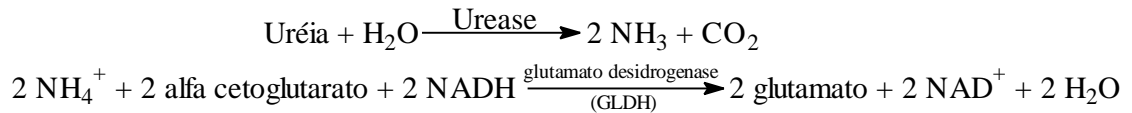
O aparelho subtraiu a absorvância encontrada do branco (solução alcalina e do indicador azul de metiltimol com soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em mg/dL de cálcio no soro sangüíneo.

A fórmula geral para a conversão da absorvância na concentração em mg/dL foi a seguinte:

$$\frac{A_{amostra}}{A_{padrão}} \times 10$$

### 3.4.4 . Determinação da uréia

Para a determinação cinética, a uréia em meio aquoso foi transformada em amônia e gás carbônico, pela ação da urease. O íon amônio, por sua vez, juntamente com  $\alpha$  cetoglutarato e NADH, em presença do glutamato desidrogenase (GLDH), são convertidos a glutamato, NAD<sup>+</sup> e água, segundo às reações:



O comprimento de onda utilizado foi de 340nm.

Para a dosagem, foi utilizado o equipamento multiparamétrico de Bioquímica (Alizé). Foi colocado no equipamento uma solução contendo 0,29 mmol/L de NADH, GLDH  $\geq$  1000U/l, Urease  $\geq$  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  $\alpha$  cetogluturato e separadamente os soros sanguíneos a serem analisados.

Após programado o equipamento, este promoveu a mistura da solução mencionada acima com os determinados soros, que foram incubados por um tempo programado à 37°C e analisados em um comprimento de onda de 340nm.

O aparelho subtraiu a absorvância encontrada do branco (solução tampão das enzimas com soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em mg/dL de uréia no soro sanguíneo.

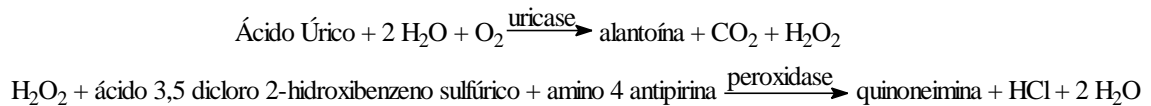
A fórmula geral para a conversão da absorvância na concentração em mg/dL foi a seguinte:

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

em que  $A = \text{absorvância}$

### 3.4.5 . Determinação do ácido úrico

O ácido úrico presente na amostra foi determinado por sua reação com água e oxigênio em presença da enzima uricase, produzindo alantoína, 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 comprimento de onda utilizado foi de 520nm.

Para a dosagem, foi utilizado o equipamento multiparamétrico de Bioquímica (Alizé). Foi colocado no equipamento uma solução contendo as referidas enzimas, solubilizados com um tampão pH  $6,95 \pm 0,15$  a 150 mmol/L e separadamente os soros sangüíneos a serem analisados.

Após programado o equipamento, este promoveu a mistura da solução mencionada acima com os determinados soros, que foram incubados por um tempo programado à  $37^{\circ}\text{C}$  e analisados em um comprimento de onda de 520nm.

O aparelho subtraiu a absorvância encontrada do branco (solução tampão das enzimas com soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em mg/dL de ácido úrico no soro sangüíneo.

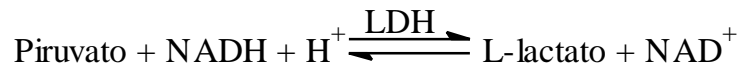
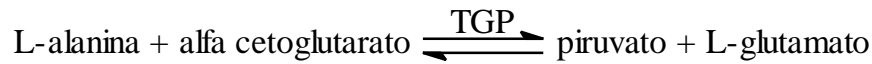
A fórmula geral para a conversão da absorvância na concentração em mg/dL foi a seguinte:

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

em que  $A = \text{absorvância}$

### 3.4.6 . Determinação da transaminase glutâmico pirúvico (TGP)

A determinação cinética da atividade da TGP se baseou na conversão da L-alanina e  $\alpha$  cetoglutarato em piruvato e L-glutamato, mediado por esta enzima. O piruvato formado reagiu com NADH e o íon hidrônio, produzindo L-lactato e  $\text{NAD}^+$ , numa reação catalisada pela lactato desidrogenase (LDH), segundo as reações:



A análise foi realizada em um comprimento de onda de 340nm.

Para a dosagem, foi utilizado o equipamento multiparamétrico de Bioquímica (Alizé). Foi colocado no equipamento uma solução contendo 0,18 mmol/L de NADH, LDH  $\geq$  1200U/l e 15 mmol/L de  $\alpha$  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 sangüíneos a serem analisados.

Após programado o equipamento, este promoveu a mistura da solução mencionada acima com os determinados soros, que foram incubados por um tempo programado à 37°C e analisados em um comprimento de onda de 340nm.

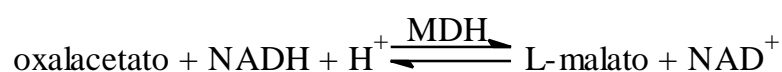
O aparelho subtraiu a absorvância encontrada do branco (solução tampão das enzimas com soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em U/l de TGP no soro sangüíneo.

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

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

### 3.4.7 . Determinação da transaminase glutâmico oxalacético (TGO)

A determinação cinética da atividade da TGO se baseou na conversão da L-alanina e  $\alpha$  cetogluturato em oxalacetato e L-glutamato, mediado por esta enzima. O oxalacetato formado reagiu com NADH e o íon hidrônio, produzindo L-malato e NAD<sup>+</sup>, numa reação catalisada pela malato desidrogenase (MDH), segundo as reações:



A análise foi realizada em um comprimento de onda de 340nm.

Para a dosagem, foi utilizado o equipamento multiparamétrico de Bioquímica (Alizé). Foi colocado no equipamento uma solução contendo 0,18 mmol/L de NADH, LDH  $\geq$  1200U/l, MDH  $\geq$  500 U/l e 12 mmol/L de  $\alpha$ -cetoglutarato, 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.

Após programado o equipamento, este promoveu a mistura da solução mencionada acima com os determinados soros, que foram incubados por um tempo programado à 37<sup>0</sup>C e analisados em um comprimento de onda de 340nm.

O aparelho subtraiu a absorvância encontrada do branco (solução tampão das enzimas com soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em U/l de TGO no soro sanguíneo.

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

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

### **3.5 . Efeito de modificadores químicos sobre a atividade de lipase**

Os flavonóides Luteolina e Apigenina e os corantes Bixina e Norbixina foram testados em presença de lipase.

A atividade enzimática foi determinada através do método de CHERRY, 1932, utilizando-se o Kit enzimático da Biobrás, em presença de éster de glicerol (balbi 6,7 g/L; Lauril sulfato de sódio 5,8 g/L) como substrato a 25<sup>0</sup>C, em tampão tris-HCl 12,1 g/L pH 8,55; azida sódica 0,5 g/L. As velocidades iniciais foram determinadas pela liberação do cromóforo a 412 nm. O estudo do efeito dos modificadores químicos foram realizados na presença e ausência dos compostos Luteolina, Apigenina, Bixina e Norbixina. Variou-se a concentração destes modificadores em concentrações fixas do substrato, onde a ação enzimática foi acompanhada pela medida da absorvância à 412 nm.

Foi feito uma solução com a concentração de  $5 \times 10^{-3}$  mol/L das substâncias a serem analisadas, sendo que a Luteolina, Apigenina e Bixina,

foram solubilizadas com propileno glicol, enquanto a Norbixina com água destilada.

O estudo cinético foi realizado marcando-se 3 tubos de ensaio, sendo eles o branco (B), o controle (C) e os modificadores (M).

As ordens de entrada dos reagentes na reação de cor foi criteriosamente seguida de acordo com o esquema abaixo:

REAGENTES	BRANCO (B)	CONTROLE (C)	BRANCOS DOS MODIFICADORES (BM)	MODIFICADORES (M)
Tampão	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
Solução de lipase (1 µg/mL)*	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
Inibidor (PMSF 3,4 g/L)	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Reagente de cor**	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Substâncias a serem testadas	-	-	Variou-se o volume de 2-20 µL	Variou-se o volume de 2-20 µL

\* A solução de lipase foi preparada dissolvendo-se 1 mg de lipase pancreática em 10 mL da solução tampão. Após misturados, retirou-se 1 mL desta solução e diluiu para 100ml com o tampão.

\*\* O reagente de cor é um solução de acetato de sódio 2,0 g/L; DTNB 1,2 g/L e azida sódica 0,5 g/L.

Homogeneizou-se bem os tubos e incubou por 2 minutos em banho maria a uma temperatura de 37 °C.

Adicionou-se o substrato apenas nos tubos controle e modificadores. Homogeneizou bem e incubou-se por exatamente 30 minutos a uma temperatura de 37 °C.

Em seguida adicionou-se 1000 µL de lauril sulfato de sódio à 8 g/L em todos os tubos, para cessar a reação.

Após encerrada a reação, adicionou-se o substrato no tubo com o branco, homogeneizou-se bem todos os tubos e efetuou-se imediatamente as

leituras fotométricas em 412nm. O aparelho foi zerado com o branco preparado como descrito acima.

Para que pudesse converter as unidades espectrofotométricas de lipase em UI, utilizou-se a seguinte fórmula.

$$Lipase(UI) = \frac{Abs. \times 1000}{7};$$

Abs. = absorvância do controle e dos modificadores.

### **3.6 . Testes estatísticos**

Foram realizados experimentos casualizados onde se aplicou o teste de Tukey (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 . Extração e determinação dos constituintes químicos do urucum**

A composição química das sementes do Urucum Fruto Verde Piloso e Fruto Vermelho são mostrados no Quadro 3. De acordo com os resultados apresentados podemos observar que os teores de cinzas, cálcio, ferro, manganês, cloretos, gorduras, carboidratos solúveis redutores, carboidratos solúveis não redutores, carboidratos solúveis totais e proteínas foram superiores para o Fruto Verde Piloso, do que para o fruto vermelho.

Os teores de bixina destes dois frutos apresentaram valores entre 3,1% e 4,8%, sendo proporcionais aos resultados quando comparados com os obtidos por DENDY (1996), que encontrou em torno de 4% de bixina em diferentes cultivares e por FERREIRA e FALESI (1995), estudando o cultivar Branca encontraram 2,6%, apresentam-se uma diferença maior em relação ao Fruto Vermelho.

Os resultados obtidos da concentração de proteínas (13%) do fruto verde piloso são praticamente iguais aos obtidos por ANGELLUCI et al. (1980), que obteve em torno de 12,82% para a Bixa orellana da variedade vermelha e aos obtidos por OHASHI et al. (1982), que foram em torno de 13,5%.

Teores de carboidratos solúveis totais (48 mg/g) são similares aos obtidos por ANGELLUCI et al. (1980), que obtiveram em torno de 47,90%.

Os valores obtidos para minerais de modo geral foram relativamente baixos, possivelmente devido a fixação de maior quantidade de nutrientes na casca do urucum e não nas sementes (FERREIRA e FALESI, 1995).

Quadro 3 - Composição química de duas variedades\* de urucum quanto aos teores de umidade, cinzas, minerais, carboidratos, proteínas e bixina.

Composição química	Fruto verde piloso	Fruto vermelho
Umidade	12,50 g %	12,70 g %
Cinzas	4,30 g %	4,20 g %
Cálcio	1,05 g %	1,04 g %
Fósforo	0,0023 g %	0,0025 g %
Ferro	0,2575 g %	0,2466 g %
Manganês	14,30 mg %	13,80 mg %
Cloretos	1,49 g %	1,45 g %
Extrato etéreo	7 g %	6,5 g %
Carboidratos ácidos digeríveis	27 g %	27,5 g %
Carboidratos redutores	31,66 mg/g	30,00 mg/g
Carboidratos não redutores	16,34 mg/g	15,00 mg/g
Carboidratos totais	48 mg/g	47,5 mg/g
Proteínas	13 g %	11 g %
Bixina	3,10 mg %	4,80 mg %

\*Variedades desenvolvidas na UFV.

A identificação de Bixina e dos compostos flavonóides por UV (ultra-violeta), IV (infra-vermelho), RMN (ressonância magnética nuclear) de hidrogênio encontra-se a seguir.

#### 4.1.1 . Espectrometria dos constituintes do urucum

##### 1. BIXINA

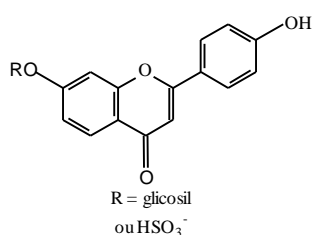
UV  $I_{CHCl_3}^{máx.} (nm) = 502 (LOG E 4,49); 471 (4,46); 416 (4,35).$

**IV**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = (3300, 1725, 1660, 1615, 1575, 1430, 1290, 1260, 1165, 1010, 965).

**RMN**  $^1\text{H}$  (80 mHz  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ ):

1,98(12 H) LARGO (4 X  $\text{CH}_3$ ); 3,77 (3H),  $\text{OCH}_3$ . 6,75 (10H); 5,89 (2H); 7,41 (1H); 7,98 (1H)

## 2. 7-O-GLICOSIL APIGENINA

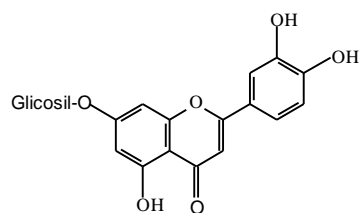


**UV**  $I_{\text{CHCl}_3}^{\text{máx.}}$  (nm) = MeOH 268, 332; NaOMe 245, 268, 301, 386;  $\text{AlCl}_3$  276, 300, 347, 387;  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  277, 298, 341, 382; NaOAc 256, 267, 355, 387, NaOAc +  $\text{H}_3\text{BO}_3$  267, 340.

**IV**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3500-3000, 1665, 1600 1500, 1450, 1350, 1300, 1250, 1200, 850, 810.

**RMN**  $^1\text{H}$  – H-2' e H-6' (7,7); H-3' E H-5' (6,85); H-8 (6,65); H-6 (6,3); H-3 (6,35); GLICOSIL H-1 5,0/3,9-3,3 (6H).

## 3. 7-O-GLICOSIL LUTEOLINA



**UV**  $I_{CHCl_3}^{máx.}$  (nm) = MeOH 255, 267; NaOMe 263, 300, 394; AlCl<sub>3</sub> 274, 298, 329, 432; AlCl<sub>3</sub>/HCl 273, 294, 358, 387; NaOAc 259, 266, 365, 405, NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 259, 372.

**IV**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3500-3000, 1660, 1590 1510, 1445, 1350, 1300, 1255, 1190, 850, 800.

**RMN** <sup>1</sup> H – H-6' (7,45); H-2' (7,3); H-5' (6,90); H-8' (6,70); H-3 (6,40); H-6 (6,35); GLICOSIL H-1 5,0/3,9-3,3 (6H).

**RMN** <sup>13</sup> C (d) – C-2 164,5; C-3 103,3; C-4 182,2; C-5 162,1; C-6 99,2; C-7 164,7; C-8 94,2 C-9 157,9; C-10 104,2; C-1' 122,1; C-2' 113,8; C-3' 146,2; C-4' 150,1; C-5' 116,4; C-6' 119,3.

#### **4.2 . Primeiro ensaio biológico de curta duração (44 horas de duração)**

O experimento foi realizado com um delineamento inteiramente ao acaso, tendo seis grupos contendo seis animais em cada (seis repetições), avaliados 43 horas após o fornecimento do triton.

Os tratamentos foram constituídos por dois grupos controles, sendo que um grupo recebeu somente ração e o outro ração + triton (substância usada para induzir a hiperlipidemia), e por outros 4 grupos testes que receberam ração + triton e as seguintes substâncias: o corante bixina a 30% de pureza, bixina a 95% e os flavonóides luteolina e apigenina, todas encontradas no urucum.

Quadro 4 - Valores médios do colesterol total ( $\pm$ erro-padrão) no soro sanguíneo de coelhos, avaliados após três dias de tratamento e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração e ração + triton.

Tratamentos	Colesterol total (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + Triton
1 – Ração (R)	76,16 $\pm$ 2,78		
2 - R + Triton (T)	676,04 $\pm$ 43,15	787,66 #	
3 - R + T + bixina 30%	258,73 $\pm$ 42,01 b	239,72 *	-61,73 *
4 - R + T + bixina 95%	417,44 $\pm$ 23,80 a	448,11 *	-38,25 *
5 - R + T + luteolina	320,54 $\pm$ 41,29 ab	320,88 *	-52,59 *
6 - R + T + apigenina	338,81 $\pm$ 21,67 ab	344,87 *	-49,88 *

Médias Seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ).  
DMS Dunnett = 84,10 mg/dL.

# Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo teste F ( $P < 0,05$ )

Com relação à análise dos constituintes sanguíneos deste ensaio, o quadro 4 nos mostra que o grupo controle, tratado com triton (grupo 2), elevou em 787,66% o nível de colesterol em relação ao grupo tratado apenas com ração (grupo 1), sendo este valor estatisticamente diferente pelo teste F ( $P < 0,05$ ). Com relação aos grupos que receberam as substâncias em estudo, todos obtiveram uma redução considerável em relação ao grupo tratado com ração e triton. O melhor resultado foi obtido com a bixina a 30%, que teve uma redução de 61,73%. Os animais que receberam a apigenina e a luteolina obtiveram valores estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ), que foram respectivamente, 49,88% e 52,59% e a bixina a 95% obteve o menor resultado, 38,25%.

Quadro 5 - Valores médios de triacilgliceróis ( $\pm$ erro-padrão) no soro sanguíneo de coelhos, avaliados após três dias de tratamento e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração e ração + triton.

Tratamentos	Triacilgliceróis (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + Triton
1 – Ração (R)	179,45 $\pm$ 8,18		
2 - R + Triton (T)	1.501,82 $\pm$ 95,36	736,90	
3 - R + T + bixina 30%	170,25 $\pm$ 22,11 b	-5,13	-88,66 *
4 - R + T + bixina 95%	1.694,00 $\pm$ 27,37 a	844,00 *	12,60 *
5 - R + T + luteolina	1.530,38 $\pm$ 51,83 a	752,82 *	1,90
6 - R + T + apigenina	1.586,03 $\pm$ 109,35 a	783,83 *	5,61

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ).  
DMS Dunnett = 166,68 mg/dL.

# Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo teste F ( $P < 0,05$ )

O quadro 5, por sua vez, nos mostra que o grupo controle tratado com triton, elevou em 736,90% o nível de triacilglicerol em relação ao grupo tratado apenas com ração, sendo este valor estatisticamente diferente pelo teste F ( $P < 0,05$ ). Com relação aos grupos que receberam as substâncias em estudo, apenas o tratado com bixina a 30%, reduziu significativamente o nível de triacilglicerol em relação ao grupo tratado com ração e triton, sendo este valor de 88,66% e estatisticamente diferente pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ). Os outros três tratamentos tiveram valores estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ) e elevaram o nível de triacilglicerol em 1,90% para a luteolina, 5,61% para a apigenina e 12,60 para a bixina a 95%, sendo este último estatisticamente diferente do grupo tratado com ração e triton, pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ).

A redução do triacilglicerol no soro dos animais que receberam bixina a 30% foi de 5,13% quando se comparou o grupo 3 com o grupo 1, que só

recebeu ração, sendo estes valores estatisticamente iguais pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ) (quadro 5).

Quadro 6 - Valores médios de colesterol-HDL ( $\pm$ erro-padrão) no soro sanguíneo de coelhos, avaliados após três dias de tratamento e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração e ração + triton.

Tratamentos	Colesterol-HDL (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + Triton
1 – Ração (R)	40,71 $\pm$ 5,14		
2 - R + Triton (T)	57,64 $\pm$ 8,64	41,60#	
3 - R + T + bixina 30%	39,17 $\pm$ 5,08c	-3,78	-32,05
4 - R + T + bixina 95%	82,14 $\pm$ 13,34 b	+101,79 *	+42,50 *
5 - R + T + luteolina	69,83 $\pm$ 13,80 bc	+71,54 *	+21,14
6 - R + T + apigenina	219,99 $\pm$ 1,82 a	+440,40 *	+281,63 *

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

\*Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ).

DMS Dunnett = 164,66 mg/dL.

# Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo teste F ( $P < 0,05$ )

Já o aumento provocado pelo triton no colesterol-HDL foi de 41,60% em relação ao grupo controle tratado apenas com ração, sendo este valor estatisticamente igual pelo teste F ( $P < 0,05$ ), como mostrado no quadro 6.

Os altos níveis de colesterol-HDL reduzem os riscos de cardiopatias coronárias. Seu efeito é oposto ao do colesterol-LDL. Nas populações em que são altas as concentrações tanto de LDL como de colesterol-HDL, os indivíduos com níveis menores de HDL estão mais expostos a cardiopatias coronárias. As partículas de HDL facilitam o transporte de colesterol dos tecidos periféricos ao fígado para a sua excreção (FUENTES, 1998).

Com relação a esta informação, os grupos que apresentaram melhores resultados foram os tratados com bixina a 95% e os tratados com apigenina, que aumentaram os índices de colesterol-HDL em relação ao grupo tratado com ração e triton, nos respectivos valores de 42,50% e 281,63%, de acordo com o quadro 6, sendo estes valores estatisticamente significativos entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ) e estatisticamente diferentes ainda do grupo 2, pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ).

Os animais tratados com luteolina obtiveram um aumento de 21,14 % em relação ao grupo 2, sendo que não houve diferença significativa em relação ao teste de Dunnett. Eles foram diferentes em relação ao grupo tratado com apenas ração, sendo o aumento de 71,54%.

Já para a bixina a 30%, obteve-se uma redução de 32,05%, sendo que este valor não foi estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (ração + triton), pelo teste de Dunnett, voltando com o nível de colesterol-HDL destes animais próximo ao nível normal, referente ao dos animais tratados apenas com ração, como mostrado no quadro 6.

Pode-se observar também no quadro 6 que os valores obtidos pelos 4 grupos tratados com as substâncias em estudo, obtiveram as médias diferenciadas entre si, pelo teste de Tukey.

O triton foi usado neste experimento e tem sido usado como um modelo para estudar o metabolismo lipídico desde a descoberta de que o Triton WR 1339 causa hiperlipidemia em animais experimentais, por funcionar como um detergente (KELLNER et al. (1951); SCANNU (1965) e RECKNAGEL (1967)).

Tem sido pesquisado que o Triton também pode ser usado por causa do seu envolvimento no catabolismo de triacilgliceróis. Segundo estes estudos, este detergente pode inibir a lecitina colesterol acil transferase, uma enzima que é considerada responsável pela formação de uma maior quantidade de ester de colesterol no plasma, e o triton pode também inibir ação da lipase lipoproteica (ISHIKAWA e FIDGE, 1979).

Com os resultados apresentados, podemos dizer que a substância que obteve um melhor efeito foi a bixina a 30%, sendo a mais eficiente na redução do colesterol total e triacilgliceróis.

Para poder explicar a grande diferença entre os resultados obtidos pela bixina a 30% e a bixina 95%, acredita-se que a primeira, por não estar tão pura

como a outra, contenha outras substâncias, como até mesmo os flavonóides luteonina e apigenina (que foram determinados na extração da semente do urucum), possam ter aumentado o sinergismo da mesma quando associados.

Foi verificado porém que corantes naturais tem efeitos hipolipidêmicos e antioxidantes, podendo interferir nas condições diabéticas como foi mostrado em estudos realizados por BABU e SRINIVASAN, 1995. Eles mostraram a influência de curcumina 0,5% e colesterol 1% misturado à dieta de ratos normais diabéticos. Estes ratos foram alimentados durante 8 semanas, excretando, os animais, menores quantidades de albumina, ureia, creatinina e fósforo inorgânico (Pi).

Outro grupo experimental, neste estudo foi constituído por animais normais e diabéticos, como mostrado a seguir:

Animais normais

G<sub>1</sub> - Ração; G<sub>2</sub> – Ração + curcumina; G<sub>3</sub> – Ração + colesterol; G<sub>4</sub> – Ração + colesterol + curcumina

Animais diabéticos

G<sub>5</sub> - Ração; G<sub>6</sub> – Ração + curcumina; G<sub>7</sub> – Ração + colesterol; G<sub>8</sub> – Ração + colesterol + curcumina

Foi observado que a administração de curcumina não alterou a glicosúria em ratos experimentais. Os ratos diabéticos excretaram excesso de albumina, uréia e creatinina, quando comparados aos ratos normais. A excreção de albumina, uréia, creatinina, foi significativamente menor nos ratos alimentados com curcumina.

A alta excreção de Pi foi 3 vezes superior em animais diabéticos do que nos animais diabéticos que receberam curcumina.

Por este estudo verificou-se que a curcumina interfere na condição diabética pela sua ação hipolipidêmica e antioxidante (BABU et al., 1995).

A ação da luteonina e apigenina pode ser explicada pela existência de dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 e pelos grupos hidroxila nos anéis A e B, sendo eles responsáveis pela proteção contra radicais livres e ações inibidoras da peroxidação lipídica, como foi mencionado nas propriedades biológicas dos flavonóides, promovendo assim a redução nos níveis lipídicos (HUSAIN et al., 1987).

Possivelmente, os efeitos creditados à bixina sejam, também, devidos a presença das duplas ligações consecutiva em sua estrutura.

#### **4.3 . Segundo ensaio biológico com duração de 28 dias**

O experimento foi realizado com um delineamento inteiramente ao acaso, tendo-se seis grupos como descritos em materiais e métodos, contendo seis animais em cada um (seis repetições), avaliados os níveis sorológicos dos constituintes bioquímicos no tempo zero e após 28 dias de tratamento.

Os tratamentos foram constituídos por dois grupos controles, sendo um grupo alimentado só com ração e o outro com ração + colesterol + ácido cólico, e por outros 6 grupos que receberam as seguinte substâncias: o corante bixina a 95% de pureza, bixina a 95% + rutina, bixina a 95% + quercetina, rutina, quercetina e norbixina.

Os quadros 7, 8 e 9 apresentam os resultados do peso inicial, final e o ganho de peso, com seus respectivos erros-padrões, dos coelhos avaliados no período experimental de 28 dias e tratados com bixina, quercetina, rutina e norbixina.

Quadro 7 - Valores médios dos pesos iniciais ( $\pm$ erro-padrão) dos coelhos

Tratamentos	Peso inicial (Kg)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + CAC
1 – Ração (R)	1,642 $\pm$ 0,034		
2 – R + Colesterol + Ácido cólico (CAC)	1,596 $\pm$ 0,013	-2,80	
3 – CAC + bixina	1,541 $\pm$ 0,035 a	-6,15	-3,45
4 – CAC + bixina + rutina	1,558 $\pm$ 0,030 a	-5,12	-2,38
5 – CAC + bixina + quercetina	1,448 $\pm$ 0,070 a	-11,81	-9,27
6 – CAC + rutina	1,605 $\pm$ 0,066 a	-2,25	+0,56
7 – CAC + quercetina	1,501 $\pm$ 0,040 a	-8,59	-5,95
8 – CAC + norbixina	1,518 $\pm$ 0,044 a	-7,55	-4,89

DMS do teste de Dunnett a 5% de probabilidade = 0,167.

Quadro 8 - Valores médios dos pesos finais ( $\pm$ erro-padrão) dos coelhos avaliados aos 28 dias

Tratamentos	Peso final (Kg)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + CAC
1 – Ração (R)	2,288 $\pm$ 0,044		
2 – R + Colesterol + Ácido cólico (CAC)	2,234 $\pm$ 0,022	-2,36	
3 – CAC + bixina	2,264 $\pm$ 0,046 a	-1,05	+1,34
4 – CAC + bixina + rutina	2,160 $\pm$ 0,042 a	-5,59	-3,31
5 – CAC + bixina + quercetina	2,137 $\pm$ 0,057 a	-6,60	-4,34
6 – CAC + rutina	2,192 $\pm$ 0,100 a	-4,20	-1,88
7 – CAC + quercetina	2,159 $\pm$ 0,060 a	-5,64	-3,36
8 – CAC + norbixina	2,158 $\pm$ 0,055 a	-5,68	-3,40

DMS do teste de Dunnett a 5% de probabilidade = 0,212.

Quadro 9 - Valores médios do ganho de peso ( $\pm$ erro-padrão) dos coelhos, avaliados aos 28 dias

Tratamentos	Ganho de peso (Kg)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + CAC
1 – Ração (R)	0,646 $\pm$ 0,031		
2 - R + Colesterol + Ácido cólico (CAC)	0,638 $\pm$ 0,027	-1,24	
3 – CAC + bixina	0,723 $\pm$ 0,025 a	+11,92	+13,32
4 – CAC + bixina + rutina	0,602 $\pm$ 0,031 a	-6,81	-5,64
5 – CAC + bixina + quercetina	0,648 $\pm$ 0,025 a	+0,31	+1,57
6 – CAC + rutina	0,587 $\pm$ 0,044 a	-9,13	-7,99
7 – CAC + quercetina	0,658 $\pm$ 0,028 a	+1,86	+3,13
8 – CAC + norbixina	0,639 $\pm$ 0,044 a	-1,08	+0,16

DMS do teste de Dunnett a 5% de probabilidade = 0,121.

Pelos resultados apresentados nas tabelas 7, 8 e 9, observou-se para os pesos iniciais, finais e ganho de peso que não houve diferença significativa pelo teste F, entre os grupos-controles. Não houve também diferença significativa entre os grupos tratados e nem entre cada grupo tratado e cada grupo controle, pelo teste de Dunnett.

Os resultados obtidos, para colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis, no soro sanguíneo de coelhos, da raça Nova Zelândia, hipercolesterolêmicos, são apresentados nos quadros 10, 11 e 12, expressos em mg/dL, com suas respectivas porcentagens de variações.

Quadro 10 - Valores médios do colesterol total ( $\pm$ erro-padrão) no soro sangüíneo de coelhos, avaliados aos 28 dias e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração e ração + colesterol + ácido cólico

Tratamentos	Colesterol (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + CAC
1 – Ração (R)	138,33 $\pm$ 17,87		
2 – R + Colesterol + Ácido cólico (CAC)	1.590,40 $\pm$ 136,75	1049,71 #	
3 – CAC + bixina	890,20 $\pm$ 144,83 b	543,53 *	-44,03 *
4 – CAC + bixina + rutina	1.054,02 $\pm$ 58,04 ab	661,96 *	-33,73 *
5 – CAC + bixina + quercetina	1.433,40 $\pm$ 119,20 a	936,22 *	-9,87
6 – CAC + rutina	1.044,08 $\pm$ 72,35 ab	654,77 *	-34,35 *
7 – CAC + quercetina	1.032,67 $\pm$ 59,84 ab	646,53 *	-35,07 *
8 – CAC + norbixina	1.187,26 $\pm$ 195,54 ab	758,28 *	-25,35 *

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ).

DMS Dunnett = 306,48 mg/dL.

# Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo teste F ( $P < 0,05$ )

De acordo com os resultados obtidos no quadro 10, o índice de colesterol no grupo 2 (ração + colesterol + ácido cólico) teve um aumento de 1049,71% em comparação com o grupo controle que recebeu apenas ração, sendo este valor estatisticamente significativo pelo teste F. Houve uma redução no nível de colesterol, em relação ao grupo tratado com ração, colesterol e ácido cólico, sendo que o tratamento com bixina + quercetina não foi significativo (9,87% de redução) pelo teste de Dunnett. Os tratamentos realizados com bixina + rutina (-33,73%), rutina (-34,35%), quercetina (-35,07) e norbixina (-25,35%), não diferiram entre si os seus valores pelo teste de Tukey. O melhor resultado porém foi de 44,03% de redução, atribuído ao grupo tratado com a bixina a 95% de pureza, sendo este valor estatisticamente significativo em relação aos outros

tratamentos, pelo teste de Tukey e em relação ao controle (ração + ácido cólico + colesterol), pelo teste de Dunnett, como mostrado no quadro 10.

Quadro 11 - Valores médios de triacilgliceróis ( $\pm$ erro-padrão) no soro sanguíneo de coelhos, avaliados aos 28 dias e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração e ração + colesterol + ácido cólico

Tratamentos	Triacilgliceróis (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + CAC
1 – Ração (R)	113,78 $\pm$ 19,52		
2 – R + Colesterol + Ácido cólico (CAC)	266,72 $\pm$ 60,96	134,42 #	
3 – CAC + bixina	228,79 $\pm$ 29,21 ab	101,08 *	-14,22
4 – CAC + bixina + rutina	202,26 $\pm$ 13,22 ab	77,76 *	-24,17
5 – CAC + bixina + quercetina	162,90 $\pm$ 16,66 b	43,17	-38,92 *
6 – CAC + rutina	169,19 $\pm$ 23,99 b	48,70	-36,57 *
7 – CAC + quercetina	153,30 $\pm$ 8,73 b	34,73	-42,52 *
8 – CAC + norbixina	292,32 $\pm$ 25,22 a	156,92 *	9,60

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ). DMS Dunnett = 77,51 mg/dL.

# Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo teste F ( $P < 0,05$ )

O quadro 11 mostra um aumento de 134,42% no nível de triacilgliceróis no grupo controle tratado com ração + colesterol + ácido cólico, em relação ao tratado apenas com ração, sendo este valor estatisticamente significativo pelo teste F. Houve redução em todos os tratamentos em comparação com o grupo controle (ração + colesterol + ácido cólico), com exceção do grupo tratado com norbixina, que teve um aumento de +9,60% no nível de triacilglicerol, sendo o valor obtido, estatisticamente igual se comparado com o grupo controle mencionado. Os tratamentos que diferiram deste controle em relação ao teste

de Dunnett foram o da rutina (-36,57%), bixina + quercetina (-38,92%) e o da quercetina (-42,52%), sendo estas reduções iguais entre si pelo teste de Tukey. Os tratamentos feitos com bixina e bixina + rutina não diferem entre si pelo teste de Tukey, cuja redução foi respectivamente iguais a 14,22% e 24,17%, não havendo diferença significativa em relação ao do grupo controle tratado com ração + colesterol + ácido cólico, pelo teste de Dunnett.

Quadro 12 - Valores médios de Colesterol-HDL ( $\pm$ erro-padrão) no soro sangüíneo de coelhos, avaliados aos 28 dias e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração e ração + colesterol + ácido cólico

Tratamentos	Colesterol-HDL (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + CAC
1 – Ração (R)	47,96 $\pm$ 2,96		
2 – R + Colesterol + Ácido cólico (CAC)	155,17 $\pm$ 9,93	223,54 #	
3 – CAC + bixina	137,43 $\pm$ 8,71 a	186,55 *	-11,43
4 – CAC + bixina + rutina	160,03 $\pm$ 19,96 a	233,67 *	3,13
5 – CAC + bixina + quercetina	133,77 $\pm$ 17,01 a	178,92 *	-13,79
6 – CAC + rutina	173,42 $\pm$ 13,53 a	261,59 *	11,76
7 – CAC + quercetina	134,51 $\pm$ 3,83 a	180,46 *	-13,31
8 – CAC + norbixina	131,55 $\pm$ 21,84 a	174,29 *	-15,22

Médias Seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ).

DMS Dunnett = 37,25 mg/dL.

# Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo teste F ( $P < 0,05$ )

Já o nível de Colesterol-HDL do grupo tratado com ração + colesterol + ácido cólico, teve um aumento de 223,54% em relação ao grupo 1, de acordo com o quadro 12. As médias obtidas pelos tratamentos com as substâncias não

diferiram entre si pelo teste de Tukey, sendo que nenhum deles obteve uma diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo 2 (colesterol + ácido cólico + colesterol). Em contrapartida, o aumento foi significativo se compararmos com o grupo 1 (ração), pelo teste de Dunnett.

Estes valores mostram que os melhores resultados foram conferidos aos flavonóides rutina e quercetina, uma vez que elas reduziram significativamente os níveis de colesterol e triacilgliceróis, em relação ao grupo hiperlipidêmico tratado com ração + colesterol + ácido cólico, mantendo estatisticamente igual o nível alto de Colesterol-HDL, em comparação com este grupo controle, pelo teste F.

Para explicar o mecanismo de ação de alguns flavonóides, pesquisadores têm demonstrado diversos dos seus efeitos biológicos.

Tem-se verificado que os flavonóides são hábeis em inibir as enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico, tais como lipoxigenase e ciclooxigenase (GRYGLEWIKI et al.(1987), DE WHALLEY et al. (1990) e LAUGHTON et al. (1991)). O ácido araquidônico é um ácido graxo insaturado que serve como precursor de prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos. Todos estes são potentes mediadores no controle de uma série de processos no corpo. Nos passos da formação desses compostos, os intermediários prostaglandinas ( $G_2$ ) e prostaglandina endoperóxido ( $PGG_2$ ) são formadas pela ação da enzima prostaglandina-endoperóxido sintetase, um complexo enzimático contendo ciclooxigenase e peroxidase. A ciclooxigenase produz  $PGG_2$ , tendo como substrato o ácido araquidônico e a peroxidase produz  $PGH_2$  a partir de  $PGG_2$ . Durante a atividade da peroxidase, radicais orgânicos livres são produzidos, com os quais dão a formação de intermediários de oxigênio reativo e a peroxidação lipídica patológica.

Flavonóides também têm uma variedade de papéis em células de mamíferos. Muitos possuem atividade antioxidante, antialérgica e anti-hemorrágica. Eles também inibem diversas enzimas como as fosfolipases, ciclooxigenase, lipoxigenase, aldose redutase (GOKER et al., 1995 e FOURIE et al., 1984).

KELLIS e VICKERY (1984), mostram o efeito de flavonóides sobre enzimas, tais como estrogênio sintetase citocromo p-450 que catalisa a conversão de androgênio para estrogênio. Diversos flavonóides têm ação

inibidora sobre a aromatização da androstenediona para estrona e de testosterona 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 importante, visto que os glicocorticóides aumentam a taxa de mobilidade de gordura pelo aumento da permeabilidade da membrana celular.

Estudos de mecanismo de ação realizadas por outros pesquisadores mostram que os flavonóides são capazes de aumentar a atividade da lipase. Esta enzima hidrolisa os triacilgliceróis (LIMA et al., 1999).

#### **4.4 . Testes de toxicidade aguda**

Nos quadros 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19, estão representadas as médias relativas aos níveis de uréia, creatinina, ácido úrico, proteínas, cálcio e as enzimas transaminase glutâmico pirúvico (TGO) e transaminase glutâmico oxalacético (TGO), avaliadas no soro dos coelhos hiperlipidêmico, que receberam as substâncias bixina, bixina + rutina, bixina + quercetina, rutina, quercetina e norbixina, após 28 dias de tratamento, comparando-os com os níveis dos controles.

Quadro 13 - Valores médios de Uréia ( $\pm$ erro-padrão) no soro sangüíneo de coelhos, avaliados aos 28 dias e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração e ração + colesterol + ácido cólico

Tratamentos	Uréia (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + CAC
1 – Ração (R)	38,60 $\pm$ 1,55		
2 – R + Colesterol + Ácido cólico (CAC)	27,03 $\pm$ 1,06	-29,07 #	
3 – CAC + bixina	26,70 $\pm$ 1,54 a	-30,83 *	-1,22
4 – CAC + bixina + rutina	27,07 $\pm$ 1,36 a	-29,87 *	0,15
5 – CAC + bixina + quercetina	25,48 $\pm$ 0,85 a	-33,99 *	-5,73
6 – CAC + rutina	24,83 $\pm$ 1,21 a	-35,67 *	-8,14
7 – CAC + quercetina	25,84 $\pm$ 1,30 a	-33,06 *	-4,40
8 – CAC + norbixina	26,77 $\pm$ 1,48 a	-30,65 *	-0,96

Médias Seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

\*Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ). DMS Dunnett = 3,52 mg/dL.

# Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo teste F ( $P < 0,05$ )

De acordo com o quadro 13, houve uma redução de 29,07% de uréia do grupo 2 em relação ao grupo 1, sendo este valor estatisticamente significativo pelo teste (F). Os grupos tratados com as substâncias em estudos, não obtiveram uma diferença significativa entre si pelo teste de Tukey, mas foram estatisticamente significativos em relação ao grupo 1 pelo teste de Dunnett.

Comparando-se o grupo 2 com os grupos 3, 4, 5, 6, 7 e 8, observou-se que estes obtiveram os valores de -1,22%, +0,15%, -5,73%, -8,14%, -4,40% e -0,96%, respectivamente, sendo que não houve diferença significativa pelo teste de Dunnett.

Sendo o fígado o órgão de formação da uréia, a redução de sua concentração no soro sangüíneo, provavelmente pode ter sido ocasionada pelo

aumento substancial do nível de colesterol no sangue, sendo que o fígado é também o local de degradação do colesterol.

Em mamíferos, pela desaminação dos aminoácidos há liberação de amônia, que pelo ciclo da uréia no fígado, esta amônia é convertida em uréia, que é a sua principal forma de excreção do nitrogênio. Já para os coelhos, por ser um herbívoro, não tem microorganismos no estômago e no intestino delgado, sendo que no intestino grosso há uma grande população de microorganismos com atividade proteolítica que podem utilizar o amoníaco e a uréia, como fonte de nitrogênio (CHEEKE, 1995).

Quadro 14 - Valores médios de Creatinina ( $\pm$ erro-padrão) no soro sangüíneo de coelhos, avaliados aos 28 dias e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração e ração + colesterol + ácido cólico

Tratamentos	Creatinina (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + CAC
1 – Ração (R)	1,17 $\pm$ 0,05		
2 – R + Colesterol + Ácido cólico (CAC)	1,32 $\pm$ 0,06	12,82	
3 – CAC + bixina	1,15 $\pm$ 0,08 a	-1,71	-12,88 *
4 – CAC + bixina + rutina	1,27 $\pm$ 0,08 a	8,55	-3,79
5 – CAC + bixina + quercetina	1,19 $\pm$ 0,02 a	1,71	-9,85
6 – CAC + rutina	1,27 $\pm$ 0,05 a	8,55	-3,79
7 – CAC + quercetina	1,36 $\pm$ 0,04 a	16,24 *	3,03
8 – CAC + norbixina	1,28 $\pm$ 0,03 a	9,40	-3,03

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ).

DMS Dunnett = 0,15 mg/dL.

Observando-se o quadro 14, nota-se que os valores referentes aos grupos 3, 4, 5, 6, 7 e 8, não houve diferença significativa entre si pelo teste de Tuckey, sendo que o grupo 7 (tratado com quercetina), diferiu em relação ao grupo controle (1) de acordo com o teste de Dunnett, obtendo um aumento de 16,24% e o grupo 3 (tratado com bixina), reduziu em 12,88% o nível de creatinina se comparado com o grupo 2, sendo esta redução estatisticamente significativa também pelo teste de Dunnett.

De um modo geral, pode-se dizer que não houve uma variação significativa nos níveis de creatinina no soro sanguíneo.

A creatinina é formada nos animais a partir da arginina. Pode acumular no musculo e é reservatório de grupos fosfatos. Seus níveis são alterados principalmente em insuficiência renal e obstrução urinária (LIMA et al., 1985).

Quadro 15 - Valores médios de Ácido úrico ( $\pm$ erro-padrão) no soro sangüíneo de coelhos, avaliados aos 28 dias e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração e ração + colesterol + ácido cólico

Tratamentos	Ácido úrico (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + CAC
1 – Ração (R)	0,73 $\pm$ 0,19		
2 – R + Colesterol + Ácido cólico (CAC)	1,06 $\pm$ 0,06	45,21	
3 – CAC + bixina	0,87 $\pm$ 0,13 a	19,18	-17,92
4 – CAC + bixina + rutina	0,75 $\pm$ 0,11 a	2,74	-29,25
5 – CAC + bixina + quercetina	0,88 $\pm$ 0,14 a	20,55	-16,98
6 – CAC + rutina	1,13 $\pm$ 0,11 a	54,79 *	6,60
7 – CAC + quercetina	1,15 $\pm$ 0,05 a	57,63 *	8,49
8 – CAC + norbixina	0,87 $\pm$ 0,09 a	19,18	-17,92

Médias Seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

\*Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ).  
DMS Dunnett = 0,32 mg/dL.

Analisando o quadro 15, observou-se que apenas os grupos tratados com rutina (6) e quercetina (7), obtiveram um aumento significativo no nível de ácido úrico quando comparado com o grupo 1, pelo teste de Dunnett, sendo estes valores de +54,79% e +57,63%, respectivamente.

Pelo teste de Tukey, os valores encontrados de ácido úrico no soro sangüíneo dos coelhos não diferiram entre si, nos grupos 3, 4, 5, 6, 7 e 8, de acordo com o quadro 15.

A redução ocorrida no nível de ácido úrico dos grupos 3 (-17,92%), 4 (-29,25), 5 (-16,98) e 8 (-17,92), e os aumentos dos grupo 6 (+6,60%) e 7 (+8,49), foram estatisticamente iguais ao grupo 2, tratado com ração + ácido cólico e colesterol, pelo quadro 15.

Mesmo assim, a redução de 29,25% obtido com o tratamento rutina + bixina foi considerável.

O ácido úrico nos animais é obtido por transformações sobre base purina contida nos ácidos nucléicos. As bases guaninas, pelo ação da guanase, fornecem a xantina e a adenina fornece a hipoxantina. Tanto a xantina, quanto a hipoxantina, produzirão o ácido úrico, em presença da xantinoxidase (BACILA, 1980).

Possivelmente a redução de 29,25% pode ter ocorrido por inibição da xantinoxidase. Isto é uma vantagem nos tratamentos da gota, sendo que o nível do ácido úrico pode estar elevado em pacientes com gota, leucemia, anemia hemolítica, mieloma múltipla, entre outras.

Quadro 16 - Valores médios de Proteínas ( $\pm$ erro-padrão) no soro sangüíneo de coelhos, avaliados aos 28 dias e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração e ração + colesterol + ácido cólico

Tratamentos	Proteínas (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + CAC
1 – Ração (R)	57,87 $\pm$ 1,19		
2 – R + Colesterol + Ácido cólico (CAC)	59,75 $\pm$ 1,52	3,25	
3 – CAC + bixina	57,92 $\pm$ 0,98 ab	0,09	-3,06
4 – CAC + bixina + rutina	59,18 $\pm$ 0,84 b	2,26	-0,95
5 – CAC + bixina + quercetina	58,22 $\pm$ 0,88 b	0,60	-2,56
6 – CAC + rutina	57,48 $\pm$ 0,32 ab	-0,67	-3,80
7 – CAC + quercetina	63,70 $\pm$ 2,02 a	10,07 *	6,61 *
8 – CAC + norbixina	61,47 $\pm$ 1,42 b	6,22 *	2,88

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ).

DMS Dunnett = 3,55 mg/dL.

No quadro 16, comparou-se o nível obtido de proteínas no soro sanguíneo dos coelhos do grupo 7 e 8, com o do grupo 1 e verificou-se que estes valores foram respectivamente de +10,07% e +6,22%, sendo estatisticamente significativos pelo teste de Dunnett. O grupo 7 teve ainda um aumento de 6,61% em comparação com o grupo 2, sendo também este valor estatisticamente significativo pelo teste de Dunnett.

O nível de proteínas encontrado no grupo 7 não é igual aos do grupo 4, 5 e 8, que por sua vez não são iguais aos grupos 3 e 6, pelo teste de Tukey, como comprovado no quadro 16.

Os níveis de proteínas em todos os grupos estão variando entre 57,48 a 63,70 mg/dL, de acordo com quadro 16.

Não houve portanto muita variação nos níveis de proteínas, sendo este resultado importante, pois, a síntese proteica é elevada no fígado. Se este órgão fosse afetado por estas substâncias, os níveis de proteínas iriam reduzir consideravelmente.

Quadro 17 - Valores médios de Cálcio ( $\pm$ erro-padrão) no soro sangüíneo de coelhos, avaliados aos 28 dias e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração e ração + colesterol + ácido cólico

Tratamentos	Cálcio (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + CAC
1 – Ração (R)	13,65 $\pm$ 0,39		
2 – R + Colesterol + Ácido cólico (CAC)	13,77 $\pm$ 0,40	0,88	
3 – CAC + bixina	13,95 $\pm$ 0,30 a	2,20	1,31
4 – CAC + bixina + rutina	13,38 $\pm$ 0,31 a	-1,98	-2,83
5 – CAC + bixina + quercetina	13,06 $\pm$ 0,36 a	-4,32	-5,16
6 – CAC + rutina	14,57 $\pm$ 0,33 a	6,74	5,81
7 – CAC + quercetina	13,85 $\pm$ 0,73 a	1,47	0,58
8 – CAC + norbixina	14,32 $\pm$ 0,31 a	4,91	3,99

Médias Seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ).

DMS Dunnett = 1,11 mg/dL.

De acordo com o quadro 17, não houve diferença significativa entre os resultados encontrados para os níveis de cálcio dos grupos 3, 4, 5, 6, 7 e 8, de acordo com o teste de Tukey.

Não obteve-se uma diferença significativa dos grupos 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 em relação ao grupo 1 na variação do nível de cálcio no soro sangüíneo dos coelhos de acordo com o teste de Dunnett, como observado no quadro 17.

A variação no nível de cálcio, nos grupos 3, 4, 5, 6, 7 e 8 não diferiram em relação ao grupo 2 pelo teste de Dunnett (quadro 17).

Comparando-se os níveis de cálcio obtidos no soro sangüíneo dos animais, pode-se concluir, pela análise estatística mostrada no quadro 17, que a concentração de cálcio não variou com os tratamentos mencionados.

O cálcio exerce de várias funções no organismo, como a participação do metabolismo ósseo, influi no transporte das membranas celulares, afeta a transferência dos íons através das organelas, facilita na liberação dos neurotransmissores, atua na liberação e ativação de enzima, etc.

Os seus níveis são alterados principalmente na hipercalcemia, hiperparatireoidismo, hipervitaminose D, transplantes de rins, neoplasias pelo uso de diuréticos, hipocalcemia, síndrome nefrótica e pancreatite aguada.

Quadro 18 - Valores médios de TGO ( $\pm$ erro-padrão) no soro sangüíneo de coelhos, avaliados aos 28 dias e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração e ração + colesterol + ácido cólico

Tratamentos	TGO (UI)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + CAC
1 – Ração (R)	31,00 $\pm$ 3,79		
2 - R + Colesterol + Ácido cólico (CAC)	69,80 $\pm$ 15,74	125,16 #	
3 – CAC + bixina	40,33 $\pm$ 14,78 a	30,10	-42,22 *
4 – CAC + bixina + rutina	31,40 $\pm$ 7,83 a	1,29	-55,01 *
5 – CAC + bixina + quercetina	29,40 $\pm$ 3,87 a	-5,16	-57,88 *
6 – CAC + rutina	30,40 $\pm$ 2,15 a	-1,94	-56,45 *
7 – CAC + quercetina	40,50 $\pm$ 4,67 a	30,65	-41,98 *
8 – CAC + norbixina	30,33 $\pm$ 6,62 a	-2,16	-56,55 *

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ).

DMS Dunnett = 23,73 mg/dL.

# Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo teste F ( $P < 0,05$ )

De acordo com o quadro 18, observou-se que os animais do grupo 2 aumentaram o teor de TGO no soro sanguíneo em +125,16% em relação ao grupo 1, sendo este aumento estatisticamente significativo pelo teste F.

Os níveis de TGO no sangue dos animais dos grupos 3, 4, 5, 6, 7 e 8 não diferiram entre si pelo teste de Tukey, como mostra o quadro 18, sendo porém estatisticamente iguais do valor encontrado para o grupo 1, de acordo com o teste de Dunnett. Em relação ao grupo 2, observou-se uma redução estatisticamente diferente para os grupos 3, 4, 5, 6, 7 e 8 tratados com as substâncias em análise, considerando-se o teste de Dunnett. De uma maneira geral, estas substâncias reduziram o nível de TGO no soro para um teor bem próximo aos do grupo 1.

Quadro 19 - Valores médios de TGP ( $\pm$ erro-padrão) no soro sangüíneo de coelhos, avaliados aos 28 dias e seus respectivos percentuais de variação em relação à ração e ração + colesterol + ácido cólico

Tratamentos	TGP (UI)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + CAC
1 – Ração (R)	58,60 $\pm$ 7,99		
2 - R + Colesterol + Ácido cólico (CAC)	65,97 $\pm$ 14,19	12,58	
3 – CAC + bixina	36,00 $\pm$ 3,62 a	-38,57	-45,43 *
4 – CAC + bixina + rutina	62,40 $\pm$ 9,63 a	6,48	-5,41
5 – CAC + bixina + quercetina	57,80 $\pm$ 9,64 a	-1,37	-12,38
6 – CAC + rutina	41,80 $\pm$ 9,22 a	-28,67	-36,64 *
7 – CAC + quercetina	50,40 $\pm$ 7,22 a	-13,99	-23,60
8 – CAC + norbixina	57,83 $\pm$ 6,53 a	-1,31	-12,34

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ).

DMS Dunnett = 24,04 mg/dL.

No quadro 19, observou-se que o grupo 2, tratado com ração, colesterol e ácido cólico não diferiu a porcentagem de variação no nível de TGP em

relação ao grupo 1 pelo teste F, sendo que os grupos 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, tratados como as substâncias em estudo, também não diferiram em relação ao grupo controle (1), alimentado apenas com ração, de acordo com o teste de Dunnett.

Apenas os grupos 3 e 6, reduziram significativamente os níveis de TGO no soro sangüíneo, em relação ao grupo 2, quando analisados pelo teste de Dunnett, sendo estas reduções de -45,43% e -36,64%, respectivamente, como descrito no quadro 19.

Pelo quadro 19, notou-se que as médias dos níveis de TGP no soro sanguíneos dos coelhos tratados com os corantes e flavonóides (grupos 3, 4, 5, 6, 7 e 8), não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Os valores fornecidos pela análise dos constituintes sanguíneos, Uréia, Ácido Úrico, Creatinina, Cálcio, Proteínas, TGO e TGP, nos mostram que as substâncias em estudo, praticamente não alteraram as suas concentrações em comparação com o grupo controle, tratado com apenas ração.

Para o nível de uréia, o grupo tratado com ração, colesterol e ácido cólico, reduziu significativamente este nível quando comparado com o grupo 1, como foi mencionado anteriormente, sendo que os grupos tratados com os flavonóides e corantes não interferiram neste valor.

Em contrapartida o nível de TGO que foi alterado pelo grupo 2 comparando-se como o grupo 1, teve uma redução significativamente pelas substâncias em estudo, fazendo com que estes valores retornassem ao nível normal encontrado pelas análises feitas no grupo dos animais tratados apenas com ração.

Estas enzimas (TGO e TGP), realizam reações de transaminação.

Os níveis de TGP são elevados em hepatites e icterícias e a sua variação é menor que a da TGO nos enfartes do miocárdio.

#### **4.5 . Efeito de modificadores químicos sobre a atividade de lipase**

Este experimento não foi instalado seguindo um delineamento experimental, sendo cada amostra constituída por três repetições. Assim, não foi possível proceder à análise de variância dos dados de atividade enzimática, procedendo-se a dispersão dos mesmos.

De posse da dispersão, não foi possível ajustar equações de regressão, tendo como variável dependente a atividade enzimática e independente, a concentração do modificador. Optou-se então, por apresentar os resultados na forma de histograma.

Estes dados não permitem ainda a realização do teste de média, uma vez que as concentrações do modificador são tratamentos quantitativos.

Os resultados obtidos na determinação da atividade de lipase em presença dos corantes (bixina e norbixina) e dos flavonóides (apigenina e luteolina) extraídos do urucum, encontram-se apresentados no quadro 20 e nas figuras 16, 17, 18 e 19.

Quadro 20 - Atividade de lipase em presença dos modificadores apigenina, bixina, luteolina e norbixina

Concentração do modificador [M]	Apigenina (UI)	Luteolina (UI)	Bixina a 95% (UI)	Norbixina (UI)
0	27,50 ± 0,96	27,50 ± 0,96	27,50 ± 0,96	27,50 ± 0,96
0,6 x 10 <sup>-5</sup>	23,09 ± 2,38	23,38 ± 0,27	28,76 ± 1,70	24,81 ± 2,76
1,2 x 10 <sup>-5</sup>	26,98 ± 2,79	28,36 ± 2,21	24,82 ± 0,55	27,97 ± 1,20
1,8 x 10 <sup>-5</sup>	29,54 ± 8,69	25,19 ± 5,07	29,08 ± 6,67	28,11 ± 4,26
2,4 x 10 <sup>-5</sup>	26,60 ± 2,27	29,99 ± 1,02	38,83 ± 1,34	33,37 ± 1,39
3,0 x 10 <sup>-5</sup>	29,85 ± 3,48	34,56 ± 6,32	31,12 ± 1,63	29,02 ± 2,53
3,6 x 10 <sup>-5</sup>	20,77 ± 0,35	27,93 ± 0,72	25,69 ± 1,86	30,81 ± 6,71
4,2 x 10 <sup>-5</sup>	30,81 ± 5,23	30,86 ± 0,25	26,34 ± 0,95	23,46 ± 0,29
4,8 x 10 <sup>-5</sup>	32,97 ± 5,27	67,37 ± 6,06	41,46 ± 2,99	38,80 ± 9,13
5,4 x 10 <sup>-5</sup>	39,36 ± 3,46	45,54 ± 2,78	67,40 ± 10,24	47,05 ± 3,65
6,0 x 10 <sup>-5</sup>	25,56 ± 1,06	50,73 ± 12,18	57,23 ± 18,03	23,15 ± 4,45

Média ± erro-padrão.

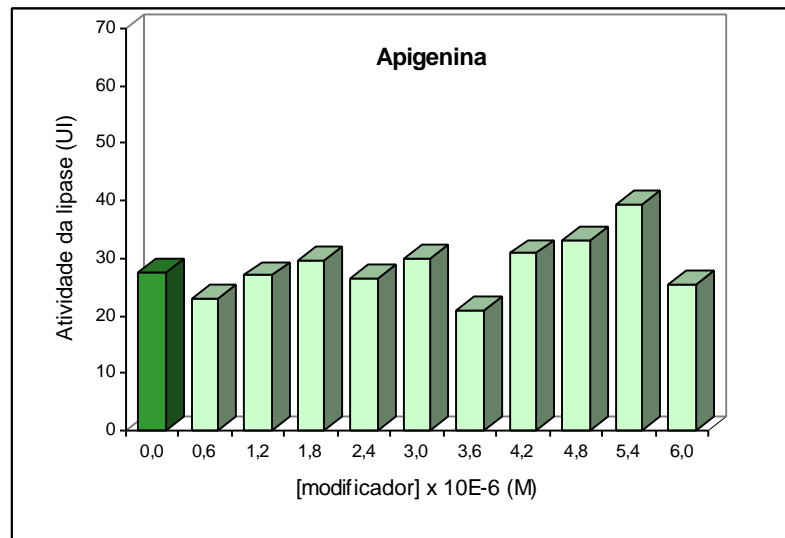


Figura 16 - Determinação da atividade da lipase na presença de várias concentrações da apigenina.

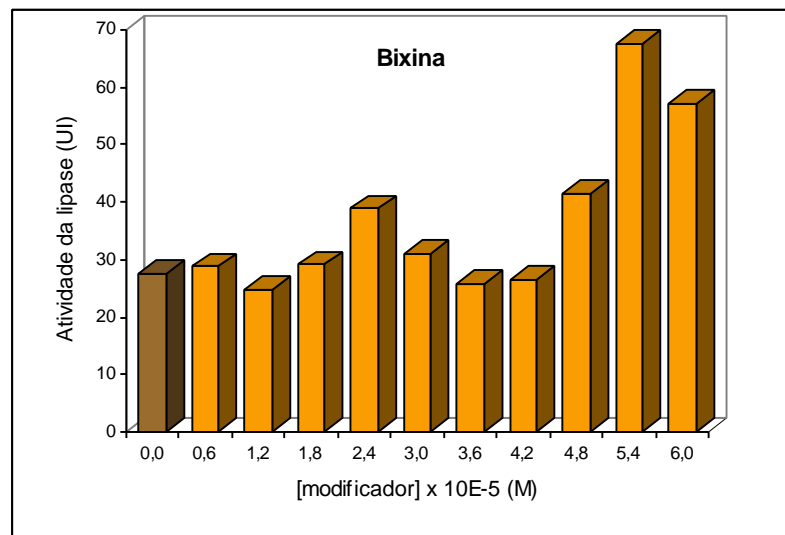


Figura 17 - Determinação da atividade da lipase na presença de várias concentrações da bixina.

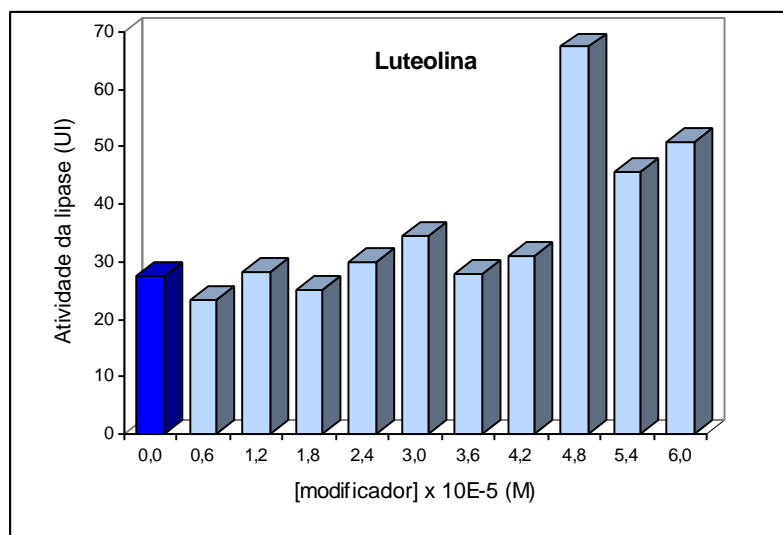


Figura 18 - Determinação da atividade da lipase na presença de várias concentrações da luteolina.

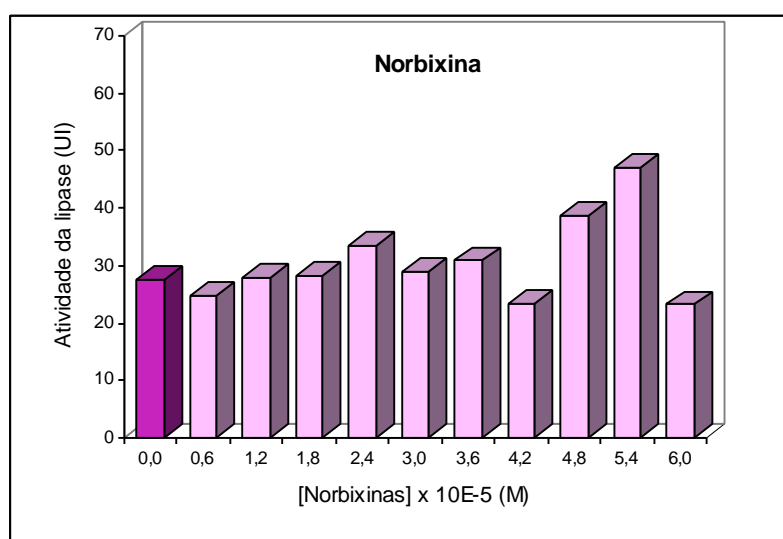


Figura 19 - Determinação da atividade da lipase na presença de várias concentrações da luteolina.

De acordo com o quadro 20 e a figura 16, observou-se que o melhor resultado apresentado pela apigenina foi obtido com uma concentração de  $5,4 \times 10^{-5}$  mol/L, sendo este atividade de 39,36 UI, o que proporciona um aumento de 43,13%.

A melhor ativação para a bixina foi de 67,40 UI, na concentração de  $5,4 \times 10^{-5}$  mol/L, obtendo-se uma porcentagem de ativação de 145% em relação ao experimento controle, que não recebeu a substância, como mostrado no quadro 20 e figura 17.

Já para a luteolina, a concentração na qual obteve-se um melhor resultado foi a de  $4,8 \times 10^{-5}$  mol/L, sendo esta ativação de 67,37 UI, ou seja, um aumento de 145%, como mostra a figura 18 e o quadro 20.

A norbixina por sua vez, apresenta-se com uma atividade de 47,05 UI, na concentração de  $5,4 \times 10^{-5}$  mol/L, o que proporciona uma ativação de 71% em comparação com o controle, de acordo com o quadro 20 e a figura 19.

Notou-se que em todos os gráficos a variação na atividade da lipase permanece praticamente inalterada em concentrações abaixo de  $4,8 \times 10^{-5}$  mol/L, sendo que nesta concentração começa a aumentar a atividade, tendo seu ápice na concentração de  $5,4 \times 10^{-5}$  mol/L, com exceção da luteolina (que apresenta o melhor resultado na concentração de  $4,8 \times 10^{-5}$  mol/L), que volta a diminuir com o aumento da concentração.

Os melhores resultados porém foram da bixina e luteolina, que alcançaram um aumento de 145% na atividade da lipase em relação aos testes feitos sem a adição dos modificadores.

Analisando a figura 2 da Revisão de Literatura, podemos ver que a estrutura da bixina e norbixina são muito semelhantes a dos ácidos graxos (que são substrato da lipase) e portanto devem estar ocupando regiões na molécula da enzima, possivelmente na região do centro ativo, modificando sua conformação e otimizando a catálise.

A bixina, como é lipossolúvel, apresentou uma maior porcentagem de atividade do que a norbixina. Esses resultados mostram que um corante lipossolúvel tem maior efeito no aumento da atividade de lipase do que um hidrossolúvel.

Flavonóides (figura 1) podem estar apenas associados à molécula da enzima, modificando sua conformação, mas não interferindo muito com a região do centro ativo da enzima. Eles podem interagir em regiões hidrofóbicas da enzima e ser estabilizado por pontes de hidrogênio.

Estes resultados mostram que os flavonóides e corantes testados modificam a atividade da lipase, que é uma enzima que, no organismo, degrada

os triacilgliceróis liberando ácido graxos e glicerol (BOREL et al, 1989). Sugeriu-se então para explicar o mecanismo de ação, a formação de quelatos entre a enzima e esses compostos. Esses quelatos induzem a mudança conformacional da enzima, modificando porém seu centro ativo (MOULIN et al., 1994).

LIMA et al. (1999) sugeriram uma estreita correlação entre a redução dos níveis de triacilgliceróis no soro e fígado de ratos com hiperlipidemia induzida por triton e a ativação da enzima lipase pelos flavonóides, sugerindo uma possível ação de flavonóide sobre os níveis de triacilgliceróis, mostrando uma interrelação entre o aumento da atividade da lipase e maior hidrólise dos triacilgliceróis.

## 5 . RESUMO E CONCLUSÕES

Os corantes naturais bixina e norbixina e os flavonóides luteolina e apigenina foram extraídos e identificados por ultravioleta, infravermelho e ressonância magnética nuclear, das sementes de duas variedades de urucum (*Bixa orellana L.*).

Os resultados evidenciados no trabalho indicaram uma eficaz ação dos flavonóides e corantes extraídos e identificados dos cultivares do urucum no metabolismo lipídico de coelhos e suas ações ativadoras sobre a lipase *in vitro*.

No primeiro ensaio biológico foram utilizados coelhos da raça Nova Zelândia, com hipercolesterolemia induzida por Triton, que receberam as substâncias luteolina, apigenina e bixina a 30 e 95% de pureza, na dose de 0,01 mol/Kg de peso corporal, por via intraperitoneal, utilizando o propilenoglicol como veículo. O sangue foi coletado 24 horas após a aplicação das substâncias e analisados os teores de colesterol, colesterol-HDL e triacilgliceróis no soro desses animais.

Neste ensaio, o Triton foi eficiente em provocar a hiperlipidemia nos animais.

Todas as substâncias foram eficientes na redução do colesterol total, sendo a mais eficiente a bixina a 30%, na qual pode conter outras substâncias como a luteolina e apigenina (que foram determinados na extração da semente do urucum), por não estar tão pura como a bixina a 95%. Desta forma, o sinergismo da mesma foi aumentado quando associada com os flavonóides.

Em relação ao colesterol-HDL, foi considerado mais eficiente a substância que promoveu um maior aumento no nível deste constituinte no soro, pois estes níveis constituem um fator de proteção nas coronariopatias (LEITE et al., 1994). A apigenina foi então a substância mais eficiente.

Quanto à redução nos níveis de triacilgliceróis, foi obtido resultado satisfatório com a administração da bixina a 30%, que reduziu em 88,66% o nível de triacilgliceróis em relação ao grupo tratado com ração e triton.

No segundo ensaio biológico, optou-se por utilizar os flavonóides quercetina e rutina, que são encontrados em larga escala no reino vegetal, a norbixina, presente também no urucum e a bixina com o teor de 95%.

Apesar da bixina a 30% ter fornecido resultados bem melhores do que a de 95%, no primeiro ensaio, resolveu-se trabalhar com esta no segundo ensaio, pois necessitava-se do efeito desta substância em seu estado mais puro, podendo assim comprovar sua ação farmacológica.

As substâncias foram testadas separadamente e associadas.

A dose usada neste experimento foi a mesma da anterior, sendo a forma de administração por via oral, em cápsula, utilizando o talco como veículo. Sendo esta forma de mais fácil manejo, menos sacrificante para o animal e com uma maior garantia das concentrações ingeridas.

A indução da hiperlipidemia foi através do ácido cólico e colesterol, colocados na ração diária dos animais. Esta forma de indução é mais próxima da real e menos sacrificante para o animal.

Todas as substâncias reduziram os teores de colesterol no soro sanguíneo dos coelhos, sendo o melhor resultado apresentado pela bixina.

Os melhores resultados na diminuição do nível de triacilglicerol foi apresentado pelas substâncias quercetina, rutina e a associação entre a bixina e quercetina.

A substância que promoveu um maior aumento no nível de colesterol-HDL foi o flavonóide rutina.

De uma maneira geral, pode-se observar que as substâncias presentes no urucum apresentaram uma ação farmacológica bastante acentuada no metabolismo lipídico de coelhos hiperlipidêmicos, sem sobretudo causar efeitos de toxicidade aguda, como foi mostrado no segundo ensaio, onde se dosou a uréia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais, cálcio, TGO e TGP.

No ensaio *in vitro*, procurou-se caracterizar o efeito dos flavonóides luteolina e apigenina e dos conrantes bixina a 95% e a norbixina sobre a atividade da lipase, variando-se as concentrações das substâncias em estudo.

Todos os compostos testados apresentaram ação ativadora na lipase nas concentrações variando de 4,8 a  $5,4 \times 10^{-5}$  mol/L, sendo os melhores resultados apresentados pela bixina e luteolina.

O aumento da atividade da lipase por essas substâncias podem ser usados para explicar, em parte, os níveis reduzidos de triacilgliceróis encontrados nos ensaios biológicos, porém não se pode comparar as concentrações utilizadas no ensaio da lipase com as utilizado nos animais, uma vez que a forma de expressar as concentrações são diferentes e também as concentrações ideais em um experimento *in vitro*, pode diferir do experimento *in vivo*.

Este trabalho demonstrou os efeitos benéficos dos principais constituintes do urucum, que é o corante natural mais utilizado em todo o mundo, principalmente na indústria alimentícia e na área de cosméticos, porém, novas pesquisas devem ser realizadas para que estes compostos possam ser utilizados como medicamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFANA'S EV, I. B., DOROZKVO, A. I., BRODSKII, A. V., KOSTYUK, V. A., POTAPOVITCH, A. I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemistry Pharmacology**, v. 38, p. 1763-1769, 1989.
- ALARCÓN DE LA LASTRA, C., MARTÍN, M. J., MARHUENDA, E. Gastric antiulcer actibity of Silymarin, a lipoxygenase inhibitor, in rats. **Journal Pharmacia Pharmacology**, v. 44, p. 929-931, 1992.
- ALCARAZ, M. J., TORDERA, M. Studies on the gastric anti-ulcer activity of hypolaetin-8-glucoside. **Phytotherapy Research**, v. 2, p. 85-88, 1988.
- ANDERSON, J. W., CHEN, W. J. L. Plant fiber., carbohydrate and lipid metabolism. **American Journal of Chemical Nutrition**, v. 32, p. 346-363, 1979.
- ANGELLUCI, E., ARIMA, H. K., KUMAGAI, E. A. Urucum I – Dados preliminares sobre a composição química. **Col. Ital. Campinas**, v. 11, p. 89-96, 1980.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**, Washington, D.C: 1984. 570 p.
- AUF'MKOLK, M., KOHRLE, J., KAMINSKI, T., JORGENSEN, E. C. Flavonoids and plant pigments inhibit iodothyronine deiodinases. **Acta Endocrinologica**, v. 96, p. 240-242, 1981. Suplemento.
- BABU, P. S., SRINIVASAN, K. Influence of dietary curcumin and cholesterol on the progression of experimentally induced diabetes in albino rats. **Molecular and Celular Biochemistry**, v. 152, p. 13-21, 1995.

- BAILEY, D. G., MALCOM, J., ARNOLD, O., SPENCE, J. D. Grapefruit juice and drugs – how significant is the interaction? **Clinical Pharmacokinetics**, v. 26, n. 2, p. 91-98, 1994
- BARICHELLO, A. W., FEDOROFF, S. Effect of ileal by-pass and alfalfa on hypercholesterolemia. **Brazil. Journal Experimental Pathology**, v. 52, p. 81-87, 1971.
- BARNAULOW, O. D., MANICHEVA, O. A., DENISENKO, P. P. Method for evaluating the effect of preparations on the ulcerogenic activity of reserpine in mice. **Farmakology Toksikology**, v. 45, p. 105-110, 1982.
- BARNAULOW, O. D., MANICHEVA, O. A., KAMISSARENKO, N. F. Comparative evaluation of the effect of some flavonoids on changes in the gastric wall of reserpine-treated or immobilized mice. *Khim. Pharmacology Zh.*, v. 17, p. 946-951, 1983.
- BACILA, M. **Bioquímica veterinária**. livro LTDA. São Paulo, SP: Varela, 1980.
- BATLOUNI, M. Hipótese oxidativa da arteriosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronária. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 68, n. 01, p. 55 – 63, 1997.
- BERETZ, A., ANTON, R., CAZENAVE, J. P. The effects of flavonoids on cyclic nucleotide phosphodiesterases. In: CODY, V. M., E. HARBORNE, J. B. (Eds.). **Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical pharmacological and structure-activity relationships**. New York: Alan R. Liss, 1986. p. 281-296.
- BEYMAN, A. C. Rabbit: A source of healthful meat? **Journal Applied Rabbit Research**, v. 7, p. 133-134, 1984.
- BHAGAVAN, N. V. **Bioquímica**. Rio de Janeiro, RJ: Interamericana, 1977.
- BOK, S. H., LEE, S. H., PARK, Y.B., BAE, K.H., SON, K. H., JEONG, T. S., CHOL, M. S. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy- $\alpha$ -methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA:cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. **Journal Nutrient**, v. 129, p. 1182-1185, 1999.
- BOREL, J. P., RANDOUX, A., MAQUART, F. X.; PEUCH, C.; VALEYRE, J. **Bioquímica dinâmica**. São Paulo: Panamericana, 1989. 800p.
- BOUSKELA, E., CYRINO, F. Z. G. A., MARCELON, G. Inhibitory effect of the Ruscus extract and of the flavonoid hesperidine methylchalcone on increased microvascular permeability induced by various agents in the Hamster-Cheek Pouch. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 225-230, 1993.

- BURTON, G. W., INGOLD, K. U.  $\beta$ -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. **Science**, v. 224, p. 569-573, 1984.
- BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L. Scavenging for receptors. **Nature**, v. 343, p. 508 – 509, 1990.
- CALDWELL, B.E., HOWELL, R. W., JUDD, R. W., JOHNSON, H. W. **Soybeans: Improvement, production and uses**. Load: American Society Agronomy, 1973. 256 p.
- CARVALHO, P. R. N. Corantes de urucum hidrossolúveis. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n. 1, p. 242-243, 1992.
- CAVALLINI, L., BINDOLI, A., SILIPRANDI, N. Comparative evaluation of antiperoxidative action of silymarin and other flavonoids. **Pharmacology Research Commun.**, v. 10, p. 133-136, 1978.
- CHAUDHRY, P. S., CABRERA, J., JULIANI, H. R., VARMA, S. D. Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids sulindac and indomethacin. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, p. 1996-1998, 1983.
- CHEEKE, P. R. Nutritional and physiological implication of saponins: A review. **Can. Journal Animal Scienc**i, v. 51, p. 621-632, 1970.
- CHEEKE, P. R., SHULL, L. R. **Natural toxicants in feeds and poisonous plants**. Westport, Connecticut: AVI, 1985.
- CHEEKE, P. R. **Alimentación y nutrición del conejo**. Zaragoza, ES: Acribia, 1995. 429p.
- CHERRY, J.S. **American Journal Physiology**, v. 100, p. 266, 1932.
- CHOI, J. S., YOCOZAWA, T., OURA, H. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 1, p. 218-224, 1991.
- CHOLBI, M. R., PAYA, M., ALCARAZ, M. J. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl<sub>4</sub>-induced microsomal lipid peroxidation. **Experientia**, v. 47, p. 195-199, 1991.
- CIORLIA, L. A. S. Intervenção dietética e níveis de colesterol plasmático em grupo de eletricitários. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 68, n. 1, p. 21 – 25, 1997.
- COHEN, B. I., MOSBACH, E. H., MATOBA, N., SUH, S. O., MCSHERRY, C. K. The effect of Alfafa-Corn diets on cholesterol metabolism and gallstones in prairie dogs. **Lipids**, v. 25, n. 3, p. 143-147, 1990.

- COS, P., YING, L., CALOMME, M., HU, J. P., CIMANGA, K., VAN POEL, B., PIETERS, L., VLIETING, A. J., VANDEN BERGHE, D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 71-76, 1998.
- DENDY, D. A. Annatto, the pigment of *Bixa orellana*. **East. African Agricultural and Forestry Journal**, p. 126-132, 1966.
- DEVLIN, T. M. **Textbook of biochemistry with clinical correlations**. 4th ed. New York, N.Y: Wiley-Liss, 1997. 1186 p.
- DE WHALEY, C. V., RANKIN, S. M., HOULT, J. R. S., JESSUP, W., LEAKE, D. S. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 39, n. 11, p. 1743-1750, 1990.
- DIEHM, C., TRAMPISCH, H. J., LANGE, S., SCHMIDT, C. Comparison of leg compression stocking and oral horse chestnut seed extract therapy in patients with chronic venous insufficiency. **Lancet**, v. 347, p. 292-294, 1996.
- DUCHARME, M. P., PROVENZO, R., DE HOORNE-SMITH, M., EDWARDS, D. J. Trough concentrations of ciclosporine following administration with grapefruit juice. **Britannica Journal Clinical Pharmacology**, v. 36, p. 457-459, 1993.
- EVANS, W. C. **Trease and Evans Pharmacognosy**. 13 th ed. London: Editora, 1989. 450 p.
- FARBOODNIAY, M. A. J., ANIL, B. R. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Pterocarpus marsupium*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 7, p. 989-994, 1993.
- FERGUSON, T. L., WALES, J. H., SINNHUBER, R. O., LEE, D. J. Cholesterol level, atherosclerosis and liver morphology in rabbits fed cyclopropenoid fatty acids. **Food Cosmet. Toxicology**, v. 14, p. 15-18, 1976.
- FERREIRA, A. W., FALESI, I. C., **Características nutricionais do fruto e teor de bixina em urucum (*Bixa orellana* L.)**. Embrapa, 1995. (Comunicado Técnico).
- FOOTE, C. S., DENNY, R. W. Chemistry of singlet and transport of carotenoids. Carotene. **Journal of American Chemistry Society**. V. 90, p. 6233-6235, 1968.
- FOURIE, T. G., SNYCKERS, F. O. A flavone with anti-inflammatory activity from the roots of *rhus undulata*. **Journal of Natural Products**, v. 47, p. 1057, 1984.
- FRAGA, C. G., MARTINO, V. S., FERRARO, G. E., COUSSIO, J. D., BOVERIS, A. Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence. **Biochemistry Pharmacology**, v. 36, p. 717-720, 1987.

- FUENTES, J. A. G. **Que alimentos convêm ao coração? Higiene Alimentar**, v. 12, n. 53, p. 7-11, 1998.
- GALVES, J., DE DA CRUZ, J. P., ZARZUELO, A., DE LA CUESTA, F. S. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes, 1995.
- GERSTER, H. Anticarcinogenic effects of common carotenoids. **International Journal of Vit. Nutrition Reserach**, v. 63, p. 93-121, 1993.
- GOHAR, A. A., ELMAZAR, M. M. A. Isolation of hipotensive flavonoids from Chenopodium species growing in egypt. **Phytotherapy Reserach**, v. 11, p. 564-567, 1997.
- GOKER, H., TUNCBILEK, M., LEONCINI, G., BUZZI, E., MAZZEI, M. ROLLAND, Y.', ERTAN, R. Synthesis and inhibitory activities na platelet aggregation of some flavonoid analogues. *Arznim-Forsch.* **Drug Reserach**, v. 45, n. 1, 1995.
- GREESKE, K., POHLMANN, B. K. Horse chestnut seed extract na effective therapy principle in general practice. Drug therapy of choronic venous insufficiency. **Fortschr. Medical**, v. 114, p. 196-200, 1996.
- GRYGLEWSKI, R. J., KORBUT, R., ROBAK, J., SWIES, J. On the mechanism of anti-thrombotic action of flavonoids. **Biochemistry Pharmacology**, v. 36, p. 317-322, 1987.
- GUERRERO, C. P., MARTÍN, M. J., MARHUENDA, E. Prevention by Rutin of gastric lesions induced by ethanol in rats: role of endogenous prostaglandins. **Gen. Pharmacology**, v. 25, n. 3, p. 575-580, 1994.
- GUTH, P. H., LEUNG, F. W. Physiology of the gastric circulation. In: JOHNOSON, L. R. (Ed.). **Physiology of the gastrointestinal tract**. 2. ed. New York: Raven Press,. 1987. p. 1031-1053.
- HAAS, H. Arzneipflanzenkunde. **B.I. Wissenschaftsverlag**, p. 13-17, 1991.
- HANNASAKI, Y., OGAWA, S., FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biological Medical**, v. 16, p. 845-850, 1994.
- HANUSCH, M., STAHL, W., SCHULZ, W. A., SIES, H. Induction of gap junctional communication by 4-oxo-retinoic acid generated from its precursor canthaxanthin. **Archivo of Biochemistry Biophysical**, v. 317, p. 423-428, 1995.
- HARPER, H. A., ROSWELL, V. W., MAYES, P. A. **Review of physioltgical chemistry**. 17. ed., California: Lange Medical Publications, 1979. p. 227-242.

- HERMANN, K. Flavonoid and flavones in food plants: a review. **Journal Food Technology**, v. 11, p. 433-448, 1976.
- HOLMES, Z. A., WEI, S. F., HARRIS, D. J., CHEEKE, P. R., PATTON, N. M. Proximate composition and sensory characteristics of meat from rabbits fed three levels of alfalfa meal. **Journal of Animal Science**, v. 58, p. 62-67, 1984.
- HOPE, W. C., WELTON, A. F., FIELDER-NAGY, C., BATULA-BERNARDO, C., COFFEY, J. W. In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substances of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity of quercetin. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, p. 367-371, 1983.
- HOSSAIN, M. Z., ZHANG, L. X., BERTRAM, J. S. Retinoids and carotenoids upregulate gap-junctional communication: correlation with enhanced growth control and cancer prevention. **Prog. Cell. Research**, v. 3, p. 301-309, 1993.
- HU, C. Q., CHEN, K., SHI, Q., KILKUSKE, R. E., CHENG, Y. C., LEE, K. H. Anti-AIDS agents, 10. Acacetin-7-o- $\beta$ -D-galactopyranoside, na anti-HIV principle from *Chryanthemum morifolium* and a structure activity correlation with some related flavonoids. **Jornal of Natural Products**, v. 57, n. 1, p. 42-51, 1994.
- HUET, R. Constituants des agrumes à effect pharmacodynamique: les citroflavonoides. **Frints**, v. 37, p. 267-271, 1982.
- HUSAIN, S. R., CILLARD, J., CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2489-2491, 1987.
- IBEWUIKE, J. C., OGUNGBAMILA, F. O., OGUNDAINI, A. O., OKEKE, I. N., BOHLIN, L. Antiinflammatory and antibacterial activities of C-methylflavonols from *Piliostigma thonningii*. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 281-284, 1997.
- ISHIKAWA, A. T., FIDGE, N. Changes in the concentration of plasma lipoproteins and apoproteins following the administration of Triton WR 1339 to rats. **Journal of Lipid Research**, v. 20, p. 254-264, 1979.
- JAHROMI, M. A. F., RAY, A. B. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Pterocarpus marsupium*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 7, p. 989-994, 1993.
- KATO, N., TOSA, N. Effects of Dietary Quercetin on Serum Lipids. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 2119-2120, 1983.
- KELLIS, J. T., VICKERY, L. E. Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones. **Science**, v. 225, p. 1032-1034, 1984.
- KELLNER, A., CORRELL, J. W., LADD, A. T. Lustained hyperlipemia induced in rabbits by means of intravenously injected surface active agents. **Journal Exp. Medical**, v. 93, p. 373-385, 1951.

- KIRK, E. A., SUTHERLAND, P., WANG, S. A., CHAIT, A., LEBOEUF, R. C. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficiente mice. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 954-959, 1998
- KONTUREK, S. J., RADECKI, T., BROZOWSKI, T., DRODOWIXZ, D. Antiulcer and gastroprotective effect of Solon, a synthetic flavonoid derivative of sophoradin. Role of endogenous prostaglandins. **Eur. Journal Pharmacology**, v. 125, p. 185-189, 1986.
- KUHNAU, J. The flavonoids. A class of semi essential food components: their role in the human nutrition. **World. Revil Nutricion Diet**, v. 24, p. 117-191, 1976.
- LACKEMAN, G. M., CLAEYS, M., RWAN GABO, P. G., HERMAN, A. G., VLEIN TINK, A. J. **Plant Mest.**, v. 52, p. 433, 1986.
- LALE, A., HERBERT, J. M., AUGEREAU, J. M., BILLON, M., LECONTE, M., GLEYE, J. Ability of different flavonoids to inhibit the procoagulant activity of adherent human monocytes. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 273-276, 1996.
- LARSON, R. A. The antioxidantes of higher plants. **Phytochemistry**, v. 27, n. 4, p. 969-978, 1988.
- LAUGHTON, M. J., EVANS, P. J., MORONEY, A., HOULT, J. R. S., HALIWELL, B. Inhibition of mamalian 5-lipoxigenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship dietary additives: Relationship to antioxidant activity and to iron reducing ability. **Biochemistry. Pharmacology**, v. 42, p. 1673-1681, 1991.
- LEITE, P. F., MARTINEZ, T. L. R., HALPERN, A. **Risco Cardiovascular: Fatores metabólicos e nutricionais, diagnósticos e tratamentos**. São Paulo: Loyola, 1994. 543 p.
- 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, 1985. 543 p.
- LIMA, L. R. P., OLIVEIRA, T. T., OLIVEIRA, M. G. A., NAGEM, T. J., PINTO, A. S., GOMES, S. M., FILHO, J. T. S. Determinação da atividade de lipase na presença de Morina, Naringenina, Naringina e Rutina. **Ciência Agrotécnica de Lavras**, v. 23, n. 3, p. 626-631, 1999.
- LIN, C. N., KUO, S. H., CHUNG, M. I. A new flavone c-Glycoside and antiplatelet and vasorelaxing flavones from *Gentiana arisanensis*, 1997.
- LOTUFO, R., RENATINI, M. A., GORDILHO, T., TOLEDO, M. B. B. G., VIEIRA, L. A. O esforço físico e a formação de radicais livres. **Ambito Medicina Desportiva**, p. 13-16. 1996.

- LUDUVING, M. M. Conheça os inimigos do colesterol. **Saúde! É vital! São Paulo Azul**, p. 169, 1997.
- MAGGIO, G. D. Azione della Quercitina sull' andamento di alcuni Processi Patologici sperimentali correlati alla Malattia arteriosclerotia. **Rivista Italiano di Science Farmacologiche**, p. 28-37, 1956.
- MAHAN, L. K. **Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 8. ed. São Paulo: Roca, 1995.
- MANGIAPANE, H., THOMPSON, J., SLATER, A., BROWN, S., BELL, G. D., WHITE, D. A. The inhibition of the oxidation of Low-Density –Lipoprotein by (+) catechin, a naturally occurring flavonoid. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 3, p. 445-450, 1993.
- MARTÍN, M. J., MOTILVA, V., ALARCÓN DE LA LASTRA, C. Quercetin and Naringenin, effects on ulcer formation and gastric secretion in rats. **Phytotherapy Research**, v. 7, p. 150-153, 1993.
- MARTINEZ, T. L. R., LOURENÇO, D. M. **Avaliação e conduta nos riscos trombo e aterogênico**. São Paulo: Art Plus, 1996. 164 p.
- MASCOLO, N., BORRELLI, F., CAPASSO, R., DI CARLO, G., IZZO, A. A., CASTALDO, S., LONGO, R. Natural products and cardiovascular disturbances. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. S121-S123, 1998.
- MATHUR, K. S., SINGHAL, S. S., SHARMA, R. D. Effect of Bengal Gram on Experimentally Induced High Levels of Cholesterol in Tissues and Serum in Albino Rats. **Jornal Nutrition**, v. 84, p. 201-204, 1964.
- McCLURE, T. D., LIEBLER, D. C. A rapid method for profiling the products of antioxidants reactions by negative ion chemical ionization mass spectrometry. **Chemistry Research Toxicology**, v. 8, p. 128-135, 1995.
- McNAMARA, D. J., KOLB, R. , PARKER, T. S., BATWIN, H., SAMUEL, E. P., BROWN, C. D., AHRENS JUNIOR, E. H. Heterogeneity of cholesterol homeostases in man, response to changes in dietary fat quality and cholesterol quantity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 79, n. 6, p. 1729-1739, 1987.
- MEDINA, J. H., VIOLA, H., WOLFMAN, C., MARDER, M., WASOWSKI, C., CALVO, D., PALADINI, A. C. Neuroactive flavonoids: new ligands for the Benzodiazepine receptors. **Phytomedicine**, v. 5, n. 2, p. 235-243, 1998.
- MICHIHIRO, S., GOTO, S., YOSCHIDA, K., HASCHIMO, T.Y., MATSUO, T., KIMOTO, M. Cholesterol-Lowering Activity Various Undigested Fractions of Soybean Protein in Rats. **Journal Nutrition**, v. 120, p. 977-985, 1990.
- MIDDLETON, E., KANDASWAMI, C. Potential health promoting properties of citrus flavonoids. **Food Technology**, v. 11, p. 115-119, 1994.

- MOOKERJE, B. K., LEE, T. P., LIPPES, H. A., MIDDLETON, E. Some effects of flavonoids on lymphocyte proliferative responses. **Journal Immunopharmacology**, v.8, p. 371-392, 1986.
- MORA, A., PAYA, M., RIOS, J. L., ALCARAZ, M. J. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. **Biochemistry Pharmacology**, v. 40, p. 793-797, 1990.
- MOREL, I., LESCOAT, G., COGREL, P., SERGENT, O., PASDELOUP, N., BRISSOT, P., CILLARD, P., CILLARD, J. Antioxidant and iron chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. **Biochemistry Pharmacology**, v. 45, p. 13-19, 1993.
- MOTILVA, M. J., ALARCÓN DE LA LASTRA, C., MARTÍN CALERO, M. J. Effects of Naringenin and Quercetin on experimental chronic gastric ulcer in rats. Studies on the histological findings. **Phytotherapy Research**, v. 6, p. 168-170, 1992.
- MOTILVA, M. J., ALARCÓN DE LA LASTRA, C., MARTÍN CALERO, M. J. Ulcer-protecting effects of Naringenin on gastric lesions induced by ethanol in rats. Role of endogenous prostaglandins. **Journal. Pharm. Pharmac.**, v. 46, p. 91-94, 1994.
- MOULIN, A., TEISSERE, M., BERNARD, C., PIERONI, G. Lipases of the Euphorbiaceae family: purification of a lipase from Euphorbia characias latex and structure function relationships with the B chain of ricin. **Proc. National Academy of Sciences**, v. 91, p. 24, 1994.
- MUKHERJEE e SENGUPTA, S. Studies on lipid responses to intersaterifield soya oil-butterfat mixture in hipercholesterolemia rats na human subjects. **J. A. O. C. S**, v. 58, n. 3, p. 278-291, 1981.
- NAGEM, T. J., ALBUQUERQUE, T. T. O., MIRANDA, L. C. G., PEREIRA, C. A. Efeito de flavonóides sobre lipídeos em ratos e sobre enzimas metabolizadoras de drogas. **Arquivo de Biologia e Tecnologia**, v. 37, n. 3, p. 471-482, 1994.
- NAGEM, T. J., OLIVEIRA, T. T., SILVA, M. C., MIRANDA, L. C. G. Efeito de derivados flavonoídicos sobre lipídeos em ratos. **Arquivo de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n. 3, p. 859-868, 1995.
- NAKANISHI, T., INADA, A., KAMBAYASHI, K., YONEDA, K. Flavonoid glycosides of the roots of Glycyrrhiza uvalensis. **Phytochemistry**, n. 24, p. 339-341, 1985.
- NEWALL, C. A., ANDERSON, K. A., PHILIPSON, J. D. Plants with hypotensive, antiatheromatous and coronarodilatating action. **Am. Journal Chin. Medical**, v. 7, p. 197-236, 1996.

- OHASHI, E. Y. O., FALESI, I. C., EGASHIRA, Y. **Urucum uma opção para o estado do Pará**, Belém: Editora, 1982. 3 p. (Boletim Informativo).
- PALOZZA, P., MOUALLA, S., KRINSKY, N. I. Effects of  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol on radical-initiated peroxidation of microsomes. **Free Radical Biological Medical**, v. 13, p. 127-136, 1992.
- PARMAR, N. S., GHOSH, M.N. Gastric anti-ulcer activity of (+)-cyanidanol-3 a histidine decarboxylase inhibitor. **Eur. Journal Pharmacology**, v. 69, p. 25-32, 1981.
- PATRONI, J. J., COLLINS, W. J., STERN, W. R. Quantitative analyses of the isoflavone phyto-oestrogens genistein, formonetin and Biochanin A in subterranean clover leaves by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 247, p. 369-373, 1982.
- PIMENTEL, F. A. **Avaliação de métodos de obtenção e da estabilidade de pigmentos de semente de urucum (*Bixa orellana L.*)**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 132 p. Dissertação de Mestrado.
- PINCKNEY, E. R., PINCKNEY, C. **The cholesterol controversy, sherpourne**. Los Angeles, 1973. 162 p.
- PINHEIRO, A. L., ALMEIDA, C. E. Morfologia da semente e de plântula de *Bixa orellana L.* Tipo "fruto verde piloso". **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 1992.
- PREGNOLATTO, W., PREGNOLATTO, N. P. **Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz., v. 1, p. 251-262, 1985.
- PRENTICE-HERNANDES, C. Influência de aquecimento da degradação térmica de bixina em extratos alcalinos de urucum (*Bixa orellana L.*). **Arquivo de Biologia e Tecnologia**, v. 36, n. 4, p. 319-328, 1993.
- RAINOVA, I., NAKOV, S. Ulcer protective activity of the flavonoids of *Genista rumelica*. **Vel. Phytotherapy Research**, v. 2, p. 137-139, 1988.
- RAMESH, M., RAO, P. H., RAMDOSS, C. S. Microwave treatment of groundnut (*Arachis hypogaea*): extractability and quality of oil and its relation to lipase and lipoxygenase activity. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, v. 28, n. 1, p. 96-99, 1995.
- RAO, D. R., CHAWAN, C. B., CHEN, C. P., SUNKI, G. R. Nutritive value of rabbit meat. In "The domestic Rabbit: Potentials, Problems, and Current Research" (P. R. Cheke, ed.), **OSU Rabbit Research Center**, p. 53-59, 1979.
- RATTY, A. K., DAS, N. P. Effects of flavonoids on non-enzymic lipid peroxidation: Structure activity relationship. **Biochemistry Medical of Metabolism Biological**, v. 39, p. 69-79, 1988.

- RECKNAGEL, R. O. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. **Pharmacology Revid**, v. 19, p. 145-208, 1967.
- REHN, D., UNKAUF, M., KLEIN, P., JOST, V., LUNKER, P. W. Comparative clinical efficacy and tolerability of oxerutins and horse chestnut extract in patients with chronic venous insufficiency. **Arneimittelforschung**, v. 46, p. 483-487, 1996.
- RIGOTTI, A., MARZOLO, M. P., ULLOA, N., GONZÁLEZ, O., NERVI, F. Effect of bean intake on biliary lipid secretion and on hepatic cholesterol metabolism in the rat. **Journal of Lipid Research**, v. 30, p. 1041-1047, 1989.
- ROBERT, A. Cytoprotection by prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 77, p. 761-767, 1979.
- SÃO JOSÉ, A. R. **A cultura do urucum: diagnóstico e perspectivas para a região do sudoeste da Bahia.** [14/01/1999]. <http://sudoeste.uesb.br./sbcn/cultura.html>. 1998
- SCHMIDT, K. L., HENAGAN, J. M., HILBURN, P. J. Prostaglandin cytoprotection against ethanol-induced gastric injury in rat: a histologic and cytologic study of the surface epithelium. **Gastroenterology**, v. 88, p. 646-649, 1985.
- SCANNU, A. Factors affecting lipoprotein metabolism. **Adv. Lipid Research**, v. 3, p. 63-138, 1965.
- SEED, M., O'CONNOR, B., PEROMBELON, N., O'DONNELL, REAVELEY, D., KNIGHT, B. L. The effect of nicotinic acid and acipimox on lipoprotein (a) concentration and turnover. **Atherosclerosis**, v. 101, p. 61-68, 1993.
- SIDHU, G. S., OAKENFULL, D. G. A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins. **British Journal of Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 643-649, 1986.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Europe Journal Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.
- SILVA, M. T. C. **Antioxidante extraído da soja.** Campinas: Universidade Federal de Campinas, 1987. 119 p. Dissertação de Mestrado.
- SILVÁN, A. M., ABAD, M. J., BERNEJO, P., VILLAR, A. Effects of compounds extracted from *Tanacetum microphyllum* on arachidonic acid metabolism in cellular systems. **Planta Medica**, v. 64, p. 200-203, 1998.
- SMITH, D. A., BANKS, S. W. Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoid phytoalexins. **Phytochemistry**, v. 25, n. 5, p. 979-995, 1986.
- STAHL, W., SIES, H. Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids. **Ann. NY Academy Science**, v. 691, p. 10-19, 1993.

- STUCKMANN, J. R., NICOLAIDES, A. N. A review of the pharmacology and therapeutic efficacy of daflon 500 mg in patients with chronic venous insufficiency and related disorders. **Jornal of Vascular Diseases**, v. 45, n. 6, p. 419-428, 1994.
- STRYER, L. **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1996. 1000p.
- SUDHEESH, S., PRESANNAKUMAR, G., VIJAYAKUMAR, S., VIJAYALAKSHMI, N. R. Hypolipidemic effect of flavonoids from *Solanum melongena*. **Plant Food Human Nutrition**, v. 51, p. 321-330, 1997.
- SYROV, V. N., KUSHBAKTOVA, Z., ABSALOVA, M. K. H., SULTANOV, M. B. **Chemical Abstracts**, v. 103, p. 206002, 1985.
- TAKAHASHI, M. Y., YABIKU, H. Corantes naturais: usos, restrições e perspectivas. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n. 1, p. 246-247, 1992.
- TAKAHASHI, M. Y. **Monografia de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade**. 2. ed. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro, 1987. p. 22-29.
- TARNAWSKI, A., HOLLANDER, D., STACHURA, J., CRAUSE, W. J., Prostaglandin protection of the gastric mucosa against alcohol injury a dynamic time-related process. **Gastroenterology**, v. 88, p. 334-352, 1985.
- TELES, F. F. F. **Nutrient analysis of pricy pear**. Tucson: University of Arizona, 1977. 157 p. Tese de Doutorado.
- TERPSTRA, A. H. M., WEST, C. E., FENNIS, J. T., FENNIS, M. C., SHOUTEN, J. A., VEEN, E. A. V. D. Hypocholesterolemic effects of dietary soy protein versus casein in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 39, p. 1-7, 1984.
- TRUSCOTT, T. G. New trends in photobiology: the photophysics and photochemistry of the carotenoids. **Journal Photochemistry Photobiological B**, v. 6, p. 359-371, 1990.
- TRUSWELL, A. S. End of static decade for coronary disease. **British Medical Journal**, v. 289, n. 64, p. 509-510, 1984.
- TSUTSUMI, S., ISHIZUKA, S. Antiinflammatory effects of the extract *Aesculus hippocastanum* and seed. **Shikwa-Gakuto**, v. 67, p. 1324-1328, 1967.
- TURATTI, J, M. Curso de controle de qualidade de óleos e farelos vegetais. **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, p. 230, 1996.

- VAHOUNY, G. V., SATCHITHANANDAM, S., CHEN, I., TEPPER, S. A., KRITCHEVSKY, D., LIGHTFOOT, F. G., CASSIDY, M. M. Dietary fibre and intestinal adaptation: effects on lipid absorption and lymphatic transport in the rat. **American Journal of Chemical Nutrition**, v. 47, p. 201-206, 1988.
- VIEIRA, E. C., FIGUEIREDO, E. A., LEITE, J. I. A., GOMES, M. V. **Química Fisiológica**. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 1995. 414 p.
- YOKOZAWA, T., DONG, E., LIU, Z. W., SHIMIZU, M. Antioxidative activity of flavones and flavonols in vitro. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 446-449, 1997.
- YOTSUMOTO, H., YANAGITA, T., YAMAMOTO, K., OGAWA, Y., CHA, J. Y., MORI, Y. Inhibitory effects of Oren-Gedoku-to and its components on cholesteryl ester synthesis in cultured human hepatocyte HepG2 cells: evidence from the cultured HepG2 cells and in vitro assay of ACAT. **Planta Medica**, v. 63, p. 141-145, 1997.
- WHITTLE, B. R. T. The defensive role played by the gastric microcirculation. **Meth. Find. Exp. Clinical Pharmacology**, v. 11, p. 35-43, 1989. Suppl. 1.
- ZECHMEISTER, L., ESWE, R. B. A stereochemical study of methyl bixin. **Journal American Chemistry Society**, v. 66, p. 322, 1994.

## **APÊNDICE**

## APÊNDICE

Quadro 1A - Resumo da análise de variância do colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis do soro de coelhos avaliados após três dias de tratamento com bixina, luteonina e apigenina, após a indução de hiperlipidemia por triton

FV	GL	Quadrado médio		
		Colesterol total	Colesterol-HDL	Triacilgliceróis
Grupos (G)	(5)	234.167,80 **	1.368.286,00 **	3.176.354,00 **
Controles (C)	1	1.079.580,00 **	42.163,49 ns	5.245.961,00 **
Tratados (T)	3	25.666,05 *	1.890.917,00 **	3.108.880,00 **
C versus T	1	14.260,85 ns	1.126.515,51 **	1.309.169,00 **
Residuo	30	6.375,43	24.438,88	25.041,93
CV (%)	.	22,95	26,30	14,25

\*\* F significativo a 1% de probabilidade.

\* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 2A - Resumo da análise de variância dos pesos inicial e final e do ganho de peso coelhos avaliados aos 28 dias e tratados com bixina, quercetina e norbixina, após a indução de hiperlipidemia por colesterol e ácido cólico

FV	GL	Quadrado médio		
		Peso inicial	Peso final	Ganho de peso
Grupos (G)	(7)	0,017660 ns	0,018930 ns	0,009979 ns
Controles (C)	1	0,006302 ns	0,008533 ns	0,000169 ns
Tratados (T)	5	0,010921 ns	0,012502 ns	0,013936 ns
C versus T	1	0,062713 *	0,061467 ns	0,000004 ns
Resíduo	40	0,012231	0,019731	0,006432
CV (%)	.	7,11	6,39	12,48

\* F significativo a 5% de probabilidade.  
 ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 3A - Resumo da análise de variância do colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis do soro de coelhos avaliados aos 28 dias e tratados com bixina, quercetina e norbixina, após a indução de hiperlipidemia por colesterol e ácido cólico

FV	GL	Quadrado médio		
		Colesterol total	Colesterol-HDL	Triacilgliceróis
Grupos (G)	(7)	1.126.956,00 **	8.657,77 **	22.058,15 **
Controles (C)	1	6.325.494,00 **	34.485,18 **	70.171,93 **
Tratados (T)	5	206.726,50 *	1.809,44 ns	16.620,82 *
C versus T	1	529.565,50 *	17.072,01 **	1.131,02 ns
Residuo	40	78.466,05	1.159,28	5.018,23
CV (%)	.	26,77	25,37	35,66

\*\* F significativo a 1% de probabilidade.

\* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 4A - Resumo da análise de variância da uréia, creatinina e ácido úrico do soro de coelhos avaliados aos 28 dias e tratados com bixina, quercetina e norbixina, após a indução de hiperlipidemia por colesterol e ácido cólico

FV	GL	Quadrado médio		
		Uréia	Creatinina	Ácido úrico
Grupos (G)	(7)	118,3437 **	0,0344 ns	0,1603 ns
Controles (C)	1	401,3633 **	0,0721 ns	0,3267 ns
Tratados (T)	5	4,5529 ns	0,0336 ns	0,1550 ns
C versus T	1	404,2781 **	0,0007 ns	0,0204 ns
Resíduo	40	10,3413	0,0183	0,0857
CV (%)	.	11,57	10,81	31,46

\*\* F significativo a 1% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 5A - Resumo da análise de variância do teor de proteínas e de cálcio do soro de coelhos avaliados aos 28 dias e tratados com bixina, quercetina e norbixina, após a indução de hiperlipidemia por colesterol e ácido cólico

FV	GL	Quadrado médio	
		Proteínas	Cálcio
Grupos (G)	(7)	27,8691 *	1,3903 ns
Controles (C)	1	10,6408 ns	0,0408 ns
Tratados (T)	5	35,5753 *	1,8998 ns
C versus T	1	6,5664 ns	0,1923 ns
Resíduo	40	10,5154	1,0265
CV (%)	.	5,46	7,33

\* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 6A - Resumo da análise de variância do TGO e do TGP do soro de coelhos avaliados aos 28 dias e tratados com bixina, quercetina e norbixina, após a indução de hiperlipidemia por colesterol e ácido cólico

FV	GL	Quadrado médio	
		TGO	TGP
Grupos (G)	(7)	1.119,3470 *	640,5093 ns
Controles (C)	1	4.516,3210 **	158,4133 ns
Tratados (T)	5	163,4891 ns	639,4623 ns
C versus T	1	2.501,6625 *	1.127,8403 ns
Resíduo	40	470,3646	482,8542
CV (%)	.	57,23	40,82

\*\* F significativo a 1% de probabilidade.

\* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.