

RENATO MATOS LOPES

**EFEITOS (HIPOLIPIDÊMICOS) DE NARINGENINA E CHITOSAN E
TOXICOLOGIA DE MONASCUS E RUTINA SOBRE O METABOLISMO
EM 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
2001

*“Não vos ensoberbais do que sabeis,
porquanto esse saber tem limites muito
estreitos no mundo em que habitais”.*

(Allan Kardec)

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela oportunidade de aperfeiçoamento moral e espiritual em busca da perfeição suprema.

Aos meus pais, pelo amor, pelo carinho, pela compreensão, pelos ensinamentos e pela dedicação, para que eu pudesse seguir em frente em minha formação acadêmica.

Aos meus irmãos, fundamentais como espelho e exemplo de vida a serem seguidos.

Aos meus primos Bete, Luiz, Flávia e Guilherme, pelos momentos de alegria e indispensável apoio ao longo do curso.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de concretizar o curso de Mestrado .

À FAPEMIG, pelo financiamento do projeto desta dissertação.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À Professora Tânia Toledo de Oliveira, pela orientação, transmissão de saber mas, sobretudo, pela amizade, pelo respeito e pela compreensão nos momentos de dificuldade ao longo desta jornada.

Ao Professor Tanus Jorge Nagem, pelos aconselhamentos, pela amizade e pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao Professor George Henrique Kling de Moraes, pela valiosa ajuda e pela atenção dispensada.

Ao Professor José Francisco da Silva (Prof. “Juquinha”), do Departamento de Zootecnia da UFV, por ceder os animais em ótimo estado para o ensaio, assim como pelos valiosos ensinamentos sobre a fisiologia e nutrição dos referidos animais.

À todos os professores os quais tive o privilégio de interagir e que foram fundamentais na aquisição de saber.

Ao Leonardo Ramos Paes Lima, pelo incansável apoio durante a realização das dosagens sorológicas e pela amizade.

Aos amigos do laboratório de Biofármacos, que muito contribuíram, direta e indiretamente para a realização deste trabalho através do trabalho, da amizade e do convívio.

Ao Sérgio, grande amigo conquistado em Viçosa e palmeirense convicto.

Aos verdadeiros amigos da UFV, que sempre ficarão em minha memória.

Agradeço a todos que contribuíram para toda a minha formação acadêmica, a concretização desta Dissertação é obra dedicada à todos vocês.

BIOGRAFIA

RENATO MATOS LOPES, filho de Joaquim Macedo Lopes e Maria das Dores Matos Lopes, nasceu na cidade do Rio de Janeiro, em 27 de fevereiro de 1974.

Em 1990, concluiu o curso de 2^o Grau na Escola Agrotécnica Federal de Alegre, Espírito Santo.

Em 1992, ingressou no Curso de Ciências Biológicas na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), onde se graduou em agosto de 1996.

Em 1998, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, em nível de Mestrado, concluindo-o em maio de 2001.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1	3
EFEITOS DE NARINGENINA E CHITOSAN EM LIPÍDIOS DE SORO SANGÜÍNEO EM COELHOS HIPERLIPIDÊMICOS INDUZIDOS POR TRITON OU COLESTEROL E ÁCIDO CÓLICO.....	3
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Lipoproteínas (LP).....	4
2.2. Colesterol, cardiopatia coronária e aterogênese.....	6
2.3. Flavonóides.....	9
2.4. Classificação dos flavonóides	9
2.5. Algumas propriedades farmacológicas relevantes dos flavonóides	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Substâncias indutoras da hiperlipidemia.....	14

	Página
3.1.1. Substâncias testadas para redução de hiperlipidemia.....	16
3.2. Primeiro ensaio biológico: efeitos de naringenina e chitosan em lipídios no soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por triton	17
3.2.1. Local da realização do ensaio.....	17
3.2.2. Modelo experimental do primeiro ensaio biológico	17
3.3. Segundo ensaio biológico: efeitos de naringenina e chitosan em lipídios no soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por colesterol e ácido cólico	18
3.3.1. Local da realização do ensaio.....	18
3.3.2. Modelo experimental do segundo ensaio biológico	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Primeiro ensaio biológico	20
4.2. Segundo ensaio biológico	25
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÕES	35
CAPÍTULO 2	36
ANÁLISE DA TOXICIDADE AGUDA DE RUTINA E MONASCUS SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM SORO SANGÜÍNEO EM COELHOS.....	36
1. INTRODUÇÃO	36
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	38
2.1. Toxicologia de flavonóides.....	38
2.2. Corantes naturais.....	40
2.3. Monascus.....	40
2.3.1. Propriedades toxicológicas do Monascus.....	42
2.3.2. Propriedades farmacológicas do Monascus	42
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1. Local da realização do ensaio biológico.....	44
3.2. Descrição dos objetivos e caracterização do tipo de ensaio biológico.....	44

	Página
3.3. Substâncias testadas	45
3.4. Divisão dos animais conforme o tratamento empregado	46
3.5. Acomodação e alimentação dos animais.....	46
3.6. Descrição da raça Nova Zelândia	47
3.7. Metodologia empregada	48
3.8. Dosagens bioquímicas	49
3.9. Análise estatística	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1. Apresentação e discussão dos parâmetros analisados	52
5. CONCLUSÃO	87
2. CONCLUSÕES GERAIS	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
APÊNDICE.....	96

RESUMO

LOPES, Renato Matos, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2001. **Efeitos (hipolipidêmicos) de naringenina e chitosan e toxicologia de monascus e rutina sobre o metabolismo em coelhos.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Conselheiros: Tanus Jorge Nagem e George Henrique Kling de Moraes.

O presente trabalho avaliou a ação do chitosan e naringenina em coelhos, por via intraperitoneal, com hiperlipidemia induzida por Triton. No segundo experimento, a hiperlipidemia foi induzida por colesterol e ácido cólico misturados à ração. Neste experimento, as substâncias chitosan, a 0,03%, e naringenina, a 0,006%, foram fornecidas aos coelhos hiperlipidêmicos durante 15 dias. Ao sétimo e décimo quinto dias foram dosados colesterol, colesterol-HDL e triacilgliceróis no soro dos animais. Para o primeiro experimento, os resultados mostraram que o chitosan associado à naringenina mostrou maior percentagem de redução para colesterol e triacilgliceróis, enquanto para colesterol-HDL, o chitosan foi mais efetivo, pois causou menor redução nos níveis deste parâmetro, permitindo que se encontrasse na circulação maior concentração deste. Este resultado é importante, levando em consideração que esta lipoproteína é responsável pelo transporte de colesterol da circulação para o fígado. Para o segundo experimento, os resultados indicaram que a associação chitosan + naringenina reduziu os níveis de colesterol em 15,24% durante os primeiros

sete dias e 61,19% no décimo quinto dia. Para colesterol-HDL as variações foram menores, mas para triacilglicerois a redução foi de 45,91% para os primeiros sete dias e de 55,62% para o décimo quinto dia, o que evidencia o efeito sinérgico destas duas substâncias. Também foram testados, em coelhos, rutina nas doses de 20, 40 e 60 mg/animal e monascus nas doses de 40, 80 e 100 mg/animal durante 28 dias ininterruptos em cápsulas via oral para se verificar o potencial toxicológico sobre o metabolismo de proteínas, minerais, lipídeos e glicose. Foram dosados vários constituintes sangüíneos. Os resultados obtidos mostraram pequenas variações nestes parâmetros.

ABSTRACT

LOPES, Renato Matos, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2001. **Hypolipidaemic effects of naringenin and chitosan and toxicology of monascus and rutin in the metabolism in rabbits.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Committee Members: Tanus Jorge Nagem and George Henrique Kling de Moraes.

The present work evaluates the action of chitosan and naringenin in rabbits by intraperitoneal route, with hyperlipidaemia induced by Triton. In the second experiment the hyperlipidaemia was induced by cholesterol and colic acid mixed to the ration. In that experiments chitosan (0.03%) and naringenin (0.006%) were supplied to hiperlipidaemic rabbits for 15 days. At the seventh and fifteenth days cholesterol, cholesterol-HDL and triacylglycerols were dosed in the serum of the animals. For the first experiment, the results showed that chitosan associated to naringenin showed larger reduction percentage for cholesterol and triacylglycerols while chitosan for cholesterol-HDL was more effective due the smallest reduction in these levels, which allows more concentration of this parameters in the blood serum. This result is important by the fact that this lipoprotein is responsible for the transport of cholesterol from the circulation to the liver. For the second experiment the results indicated that the association chitosan + naringenin reduced the cholesterol levels in 15.24% during the first seven days and 61.19% in the fifteenth day. For cholesterol-HDL the variations were not to big, but for

triacylglycerols the reduction was of 45.91% for the first seven days and of 55.62% for the fifteenth day, which evidence the synergic effect of these two substances. Rutin was tested in rabbits in the doses of 20, 40 and 60 mg/animal/daily and monascus in the doses of 40, 80 and 100 mg/animal/daily during 28 uninterrupted days. The compounds were administered in capsules by oral route in order to verify the toxicologic potential of those substances in the metabolism of proteins, minerals, lipids and glucose. It was dosed several constituents in the serum blood and the results showed small variations in these parameters.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de mortalidade nos países em desenvolvimento e/ou industrializados no mundo ocidental. ROSS (1986) já confirmava dados obtidos pelo Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia que revelavam que mais de 30% da população têm colesterol acima do nível considerado normal de até 200 mg/dL. Valores acima deste nível é correlacionado principalmente com o risco do desenvolvimento da aterosclerose. Segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 1994), as doenças cardiovasculares foram responsáveis por uma média de 300 mil óbitos e representavam os maiores custos da Previdência Social, através de licenças e aposentadorias.

Devido ao aumento da demanda de produtos que possam ser chamados de “naturais” pelo mercado consumidor, o uso de corantes naturais em produtos industrializados vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Conseqüentemente, os referidos corantes tendem a fazer parte de nossa alimentação numa escala progressiva.

Baseando-se em pesquisas científicas pode-se afirmar que os flavonóides e corantes naturais não são inócuos ao organismo. Desta forma, dependendo da dose pela qual o organismo for exposto, os referidos compostos são capazes de exercer ações antiinflamatória, antioxidante, hipotensoras, antihiperlipidêmicas e antibacterianas (WILLIANS et al., 1995). Este aspecto assume um papel relevante quando considera-se que existe a

possibilidade da utilização de determinados flavonóides e corantes naturais como princípios ativos de medicamentos, a serem utilizados para o tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, raquitismo, obesidade, diabetes e atividades carcinogênicas de xenobióticos.

Analisando-se o que foi apresentado, evidencia-se a importância e aplicabilidade de avaliações da toxicidade e atividades farmacológicas de flavonóides e corantes naturais sobre sistemas biológicos. A partir da obtenção de resultados significativos, os mesmos podem servir de instrumento para o desenvolvimento estratégico de produção em larga escala desses compostos naturais na forma de fármacos.

Este trabalho teve dois objetivos distintos: o primeiro foi verificar a eficiência do flavonóide naringenina e do chitosan (um produto natural derivado da quitina e que já é empregado como medicamento), sobre o nível lipídico de coelhos da Raça Nova Zelândia com hiperlipidemia induzida por Triton ou colesterol e ácido cólico. O segundo objetivo foi verificar a toxicidade do flavonóide Rutina e do corante natural Monascus, em três diferentes doses, sobre níveis séricos de importantes constituintes bioquímicos em coelhos da Raça Nova Zelândia. Portanto, realizou-se um teste toxicológico sub-agudo no qual os animais foram submetidos ao tratamento com as substâncias durante 28 dias ininterruptos.

Objetivando uma apresentação ordenada dos trabalhos efetuados, os mesmos foram divididos em dois capítulos, de acordo com os objetivos propostos. No primeiro capítulo apresenta-se dois ensaios biológicos com chitosan e naringenina e seus efeitos farmacológicos sobre os níveis séricos de lipídios em coelhos hipercolesterolêmicos. No segundo capítulo o estudo toxicológico realizado com monascus e rutina.

CAPÍTULO 1

EFEITOS DE NARINGENINA E CHITOSAN EM LIPÍDIOS DE SORO SANGUÍNEO EM COELHOS HIPERLIPIDÊMICOS INDUZIDOS POR TRITON OU COLESTEROL E ÁCIDO CÓLICO

1. INTRODUÇÃO

Estudos destacam a modificação oxidativa das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), através da ação dos radicais livres, no processo de formação das lesões ateroscleróticas. Evidências de oxidação lipídica são observadas em todos os estágios da aterogênese. Sabe-se que o LDL oxidado é altamente aterogênico por estimular a acumulação de colesterol nas paredes das células em formação. Esta atividade citotóxica estimula processos inflamatórios e trombóticos (BATLOUNI, 1997).

Inúmeras pesquisas têm demonstrado os efeitos de compostos naturais sobre o metabolismo lipídico, assim como outras propriedades farmacológicas sobre sistemas biológicos. Flavonóides são uma classe de substâncias de origem natural, presentes em alimentos como verduras, legumes, frutas e chás que apresentam atividades hipolipidêmicas, antioxidantes e antimutagênicas (PETERSON e DWYER, 1998).

Este trabalho é um estudo para avaliar a capacidade de chitosan e naringenina, a partir de suas ações farmacológicas, em reduzir a hipercolesterolemia induzida em coelhos da raça Nova Zelândia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Lipoproteínas (LP)

Lipoproteínas (LP) são aglomerações de moléculas com formato aproximadamente esférico que se constituem de componentes altamente hidrofóbicos em seu interior, como colesterol esterificado, triacilgliceróis, além de vitaminas lipossolúveis, e moléculas periféricas menos hidrofóbicas, ou seja, fosfolípídeos e colesterol não-esterificado. As proteínas designadas apolipoproteínas (apo-LP), formam um mosaico externo com segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos que permite a solubilidade do macroagregado em meio aquoso, sendo que as apoLP desempenham diversas funções na regulação de enzimas e de proteínas que participam do metabolismo das lipoproteínas. (QUINTÃO e NAKANDAKARE, 1992).

A classificação de uma determinada LP está relacionada com a sua densidade, uma vez que a mesma permite a sua separação através de ultracentrifugação. Desta forma, quanto maior a proporção lipídica, menor a densidade, e quanto maior a fração protéica, maior a densidade (QUINTÃO e NAKANDAKARE, 1992).

As principais classes de lipoproteínas plasmáticas, considerando as maiores e menos densas até as menores e mais densas, são os quilomícrons, as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs), as lipoproteínas de densidade intermediária (IDLs), as LDLs, e as HDLs. O

quilomícron é originado no intestino e se constitui na principal molécula de transporte dos lipídios da alimentação (exógenos). As VLDLs possuem formação hepática e iniciam o processo de transporte dos lipídios chamados de endógenos, as VLDLs originam às LDLs, quando aquelas liberam os triacilgliceróis. Quilomícrons e VLDLs apresentam grandes proporções de triacilgliceróis, sendo que o LDL e HDL transportam principalmente ésteres de colesterol. Diferenciando-se das demais lipoproteínas exógenas e endógenas, as HDLs levam o colesterol dos tecidos periféricos para ser metabolizado pelo fígado (GOTTO, 1997).

As Tabelas 1 e 2 apresentam, respectivamente, a classificação e propriedades das lipoproteínas plasmáticas, e as principais funções das apo-LP, assim como seus locais de produção.

Tabela 1 - Classificação e algumas propriedades das lipoproteínas plasmáticas*

Classe de Lipoproteínas	Lipídios Principais	Apolipoproteínas	Densidade (mg/ml)	Diâmetro (Å)
Quilomícrons	Triacilgliceróis da alimentação, Esteres de colesterol.	A-I, A-II, A-IV, B-48, C-I, C-II, C-III, E	< 0,95	800-5000
Remanescentes	Ésteres de colesterol da alimentação	B-48, E	< 1,006	>300
VLDL	Triacilgliceróis endógenos	B-100, C-I, C-II, C-III, E	< 1,006	300-800
IDL	Ésteres de colesterol, Triacilgliceróis	B-100, E	1,006-1,019	250-350
LDL	Ésteres de colesterol	B-100	1,019-1,063	180-280
HDL ₂	Ésteres de colesterol	A-I, A-II	1,063-1,125	90-120
HDL ₃	Ésteres de colesterol	A-I, A-II	1,125-1,210	50-90

* Adaptado de DE JONES et al. (1994).

Tabela 2 - Funções e locais de origem das Apolipoproteínas*

Apo-Lp	Função	Origem
A-I	Ativador de LCAT ** e remoção celular do colesterol	Intestino e fígado
A-II	Inibe remoção celular de colesterol	Intestino e fígado
A-IV	Remoção de colesterol de macrófagos; diminui a remoção de VLDL	Intestino e fígado
B-100	Reconhece o receptor B-E	Fígado
B-48	Reconhece o receptor B-E e α 2-macroglobulina	Intestino apenas
C-I	Ativador da LCAT**	Fígado
C-II	Ativador da enzima lipoproteína lipase(LP)	Fígado
C-III	Inibidor da captação de VLDL e quilomícrons por receptores	Fígado
E	Reconhecimento por receptore	Fígado

* Fonte: QUINTÃO e NAKANDAKARE (1992).

** Legenda: LCAT – Abreviatura da enzima plasmática lecitina-colesterol-acil-transferase. A LCAT é produzida no fígado e atua na esterificação do colesterol pela remoção do ácido graxo do carbono beta da lecitina com formação de lisolecitina, desta forma o colesterol é empregado para formação de HDL.

2.2. Colesterol, cardiopatia coronária e aterogênese

A aterosclerose e, em particular, a cardiopatia coronária, relaciona vários fatores de risco, tais como: idade, sexo, obesidade, estresse emocional, baixos níveis de colesterol-HDL, fumo, dietas ricas em gordura saturada e ainda predisposição genética. Estes fatores de risco são correlacionados com o aumento nos níveis sanguíneos de colesterol, assim como nas atividades oxidantes de radicais livres sobre as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ao nível endotelial. O consumo de gorduras saturadas aumentou os valores do colesterol na corrente sangüínea, impedindo a atividade dos receptores de LDL e, conseqüentemente, dificultando a sua eliminação (LEITE, 1994).

Os altos níveis de colesterol-HDL reduzem os níveis de cardiopatia coronária; seu efeito é oposto ao colesterol-LDL. O quociente colesterol

LDL/colesterol-HDL é um indicativo confiável de risco aterogênico. Indivíduos que apresentam altos níveis séricos de LDL e níveis baixos de HDL, apresentam riscos elevados de cardiopatia coronária. Ainda que os níveis de HDL possam estar condicionados geneticamente, a alimentação é um dos fatores determinante. Nos países desenvolvidos, os altos níveis sanguíneos de colesterol devem-se principalmente à uma alimentação inadequada (FEINLEB, 1984).

Reduções nas concentrações plasmáticas de lipoproteínas LDL, VLDL podem diminuir o risco do infarto do miocárdio (LIPID RESEARCH, 1987).

A Figura 1 mostra a formação de uma placa aterosclerótica. Partículas de LDL e plaquetas penetram no endotélio e causam lesões (1). Fatores de crescimento liberados pelas plaquetas estimulam as células musculares abaixo do endotélio, causando proliferação no sítio da lesão. Todo processo é acompanhado pela migração de monócitos e outras partículas de LDL (2), conseqüentemente, ocorre a formação de células espumosas (3). Desenvolve-se uma aglomeração na região de fosfolípidios, colesterol e cálcio, gradualmente ocorre a formação de saliências fibrosas e resistentes que são as placas de ateroma.

Importante se fazer uma distinção entre arteriosclerose e aterosclerose. O primeiro processo representa qualquer degeneração e endurecimento das paredes dos vasos sanguíneos, devido a inflamações crônicas que resultam em formação de tecidos fibrosos. Aterosclerose é um tipo de arteriosclerose, envolvendo participação de acúmulo, na íntima arterial, de placas de lipídios que sofrem calcificação. Na aterosclerose, ésteres de colesterol e outros lipídios são depositados no tecido conjuntivo das paredes arteriais. Desta forma, a aterosclerose é um subtipo de arteriosclerose, sendo que as duas não devem ser empregadas como palavras sinônimas.

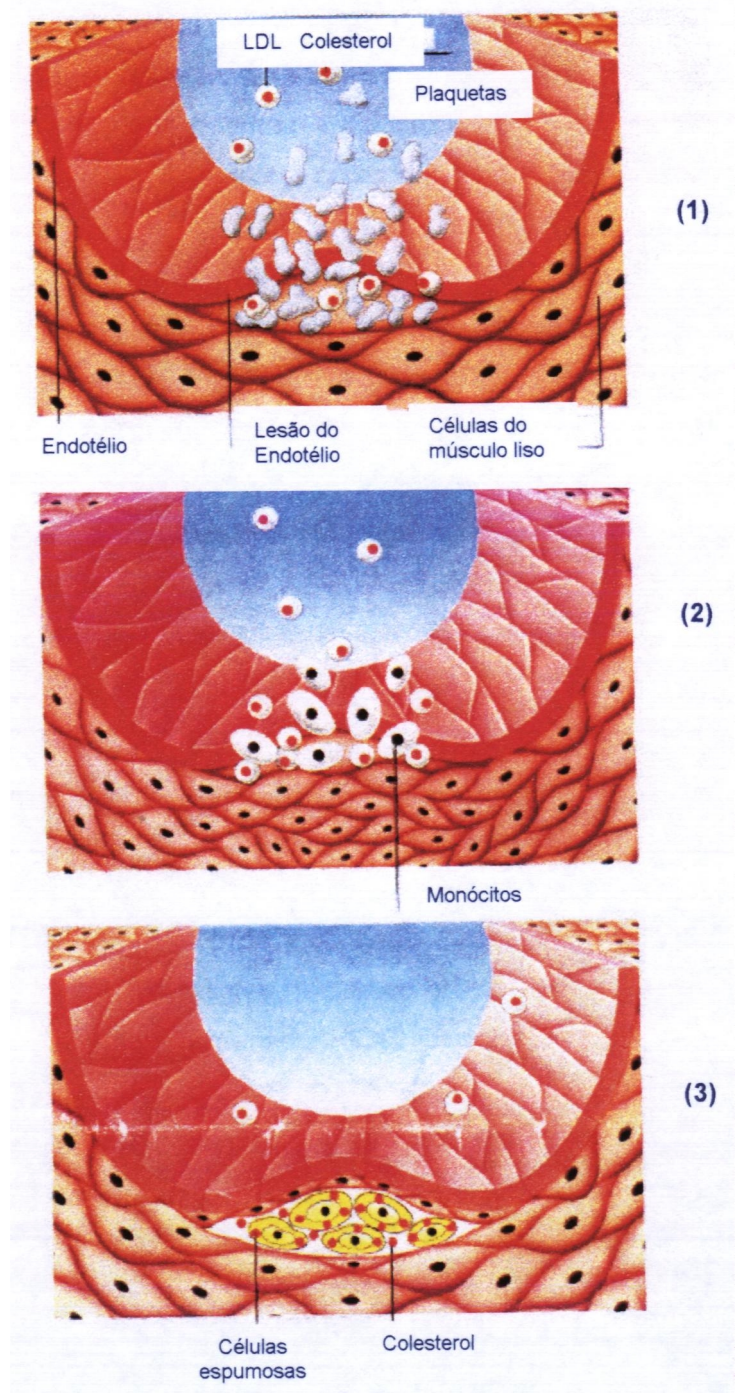


Figura 1 – Formação da placa aterosclerótica.

2.3. Flavonóides

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural cuja síntese não ocorre na espécie humana. Entretanto, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que as fazem atuar sobre sistemas biológicos. Conseqüentemente, muitas dessas propriedades podem atuar de forma benéfica para a saúde humana. Atualmente, já foram identificadas mais de 4.000 substâncias pertencentes ao grupo dos flavonóides (PETERSON e DWYER, 1998).

Estruturalmente, os flavonóides constituem substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C_{15}) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos que possuem nesta estrutura anéis aromáticos na forma $C_6-C_3-C_6$. O esqueleto C_{15} dos flavonóides é biogeneticamente derivado do fenilpropano (C_6-C_3) e três unidades de acetato (C_6). Portanto, flavonóides são derivados de benzo-gama-pirona de origem vegetal (YOKOZAWA et al, 1997), podendo haver facilmente interconversão entre eles (LOPES, 2000) (Figura 2).

2.4. Classificação dos flavonóides

Pode-se classificar os flavonóides em flavanonas, flavonas, flavonóis, isoflavonóides, antocianinas, flavan-3,4-diol, chalconas, auronas, e cumarinas. Esta classificação é devido às diferenças estruturais dos compostos que formam essas classes.

Apesar do termo “flavonóide” derivar do latim *flavus*, que significa amarelo, observa-se que os grupos flavonóis e flavonas são incolores e que a classe das antocianinas possuem substâncias que variam no seu espectro de coloração, variando do verde ao azul. A Tabela 3 mostra as principais classes de flavonóides e suas características básicas.

A explicação para a existência de uma grande diversidade estrutural dos flavonóides é explicada pelas modificações que tais compostos podem sofrer, tais como: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação dentre outras (KOES et al., 1994).

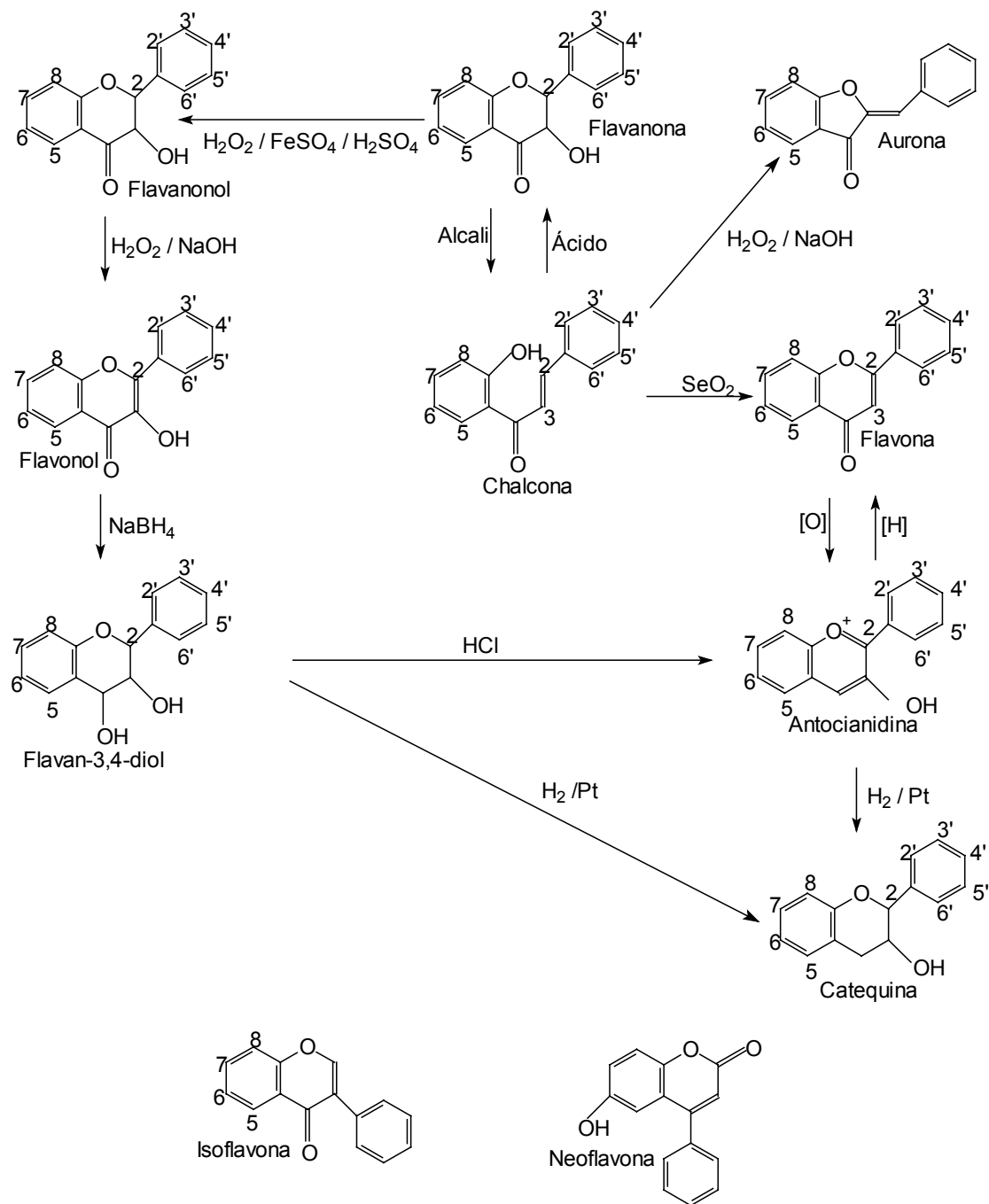


Figura 2 - Interconversão de flavonóides com a representação de seus principais grupos.

Tabela 3 - Principais classes de flavonóides e descrição de suas características básicas*

Classes	Coloração	Exemplos	Comentários
Antocianinas	Azul, vermelha e violeta	Cianidina; Delfinidina; Peonidina.	Antocianinas estão predominantemente em frutas e flores e provavelmente foram os primeiros flavonóides a serem isolados – provenientes de pigmentos florais, conforme indicam seus próprios nomes. São usadas como corantes.
Flavanas (mono, bi e triflavanas)	Incolor	Catequina; Epicatequina Luteoforol; Procianidina Theaflavina	Flavanas são encontradas em frutas e chás (verdes ou pretos). Biflavanas são encontradas em frutas, lúpulo, nozes e bebidas como chás e água de coco. O sabor peculiar de algumas bebidas, frutas, chás e vinhos é devido, principalmente, a presença das biflavanas.
Flavanonas	Incolor para um amarelo pálido.	Hesperidina; Naringenina.	Flavanonas são encontradas quase que exclusivamente em frutas cítricas.
Flavonas	Amarelo pálido	Apigenina; Luteolina; Diosmetina; Tangeretina; Nobiletina	Flavonas são encontradas quase que exclusivamente em Frutas cítricas. Mas também em cereais, frutas, ervas e vegetais. Conferem o pigmento amarelo em flores. Os compostos mais comuns são a apigenina e a luteolina.
Flavonóis	Amarelo pálido	Quercetina; Rutina; Mircetina; Kaempherol	Os flavonóis estão presentes em diversas fontes, sendo predominantes em vegetais e frutas. A quercetina é o principal representante da classe.
Isoflavonóides	Incolor	Daidzeina; Genisteina.	Isoflavonóides são encontrados quase que exclusivamente em leguminosas, particularmente na soja.

Fonte: Adaptado de PETERSON e DWYER (1998).

2.5. Algumas propriedades farmacológicas relevantes dos flavonóides

Diversos ensaios “in vivo” e “in vitro” vêm comprovando e determinando a ampla variedade das atividades biológicas dos compostos flavonoídicos. Segundo RATTY e DAS (1998), algumas dessas propriedades farmacológicas já foram observadas por Szent-Gyorgi em 1936. Destacam-se, dentre outras, os seguintes efeitos dos flavonóides sobre os sistemas biológicos: Capacidade antioxidativa (esta se constitui na atividade mais elucidada pelos estudos até agora desenvolvidos); atividades

antiinflamatória e de efeito vasodilatador; ação antialérgica; atividade contra o desenvolvimento de tumores, antihepatotóxica, antiulcerogênica; atuação antiplaquetária bem como ações antimicrobianas e antivirais.

Segundo ANTON e BERETZ (1990), as propriedades farmacológicas dos flavonóides ainda não tinham sido totalmente elucidadas. Após uma década de avanços nessa linha de pesquisa, pode-se afirmar que novos estudos toxicológicos e farmacológicos devem ser realizados, uma vez que a ampla diversidade estrutural desses compostos, bem como a capacidade de interação com outros, nos reporta a imaginar que novas descobertas ainda podem ser realizadas.

A importância dada à uma alimentação rica em frutas e legumes provém, dentre outros aspectos, da presença de substâncias antioxidantes presentes na mesma, inclusive flavonóides. Antioxidantes atuam na prevenção de inúmeras doenças e especificamente contra as doenças cardiovasculares devido a proteção exercida sobre a oxidação das LDLs (QUINTÃO e NAKANDAKARE, 1992). Modelos experimentais "in vitro" (MOREL et al., 1993; AFAVANAS'EV et al., 1989), utilizando-se hepatócitos de ratos e microssomas contendo seu sistema multienzimático citocromo P-450, comprovaram a inibição da peroxidação de lipídios bem como a remoção de íons de ferro que conduzem a processos de formação de radicais livres.

Dados recentes mostram que a mistura de flavonóides apresentaram ação hipotensiva em sistema cardiovascular de coelhos e ratos com hipertensão induzida. A kaempferitina na dose de 290 µg/Kg em coelhos, diminuiu a pressão sanguínea em 32% e a frequência cardíaca em 29%, já a mistura diminuiu a pressão em 41% e a frequência cardíaca em 33% na dose de 20 µg/Kg. A alta atividade da mistura pode ser atribuída a seu efeito sinérgico (GOHAR et al., 1997).

Os mecanismos bioquímicos responsáveis pelos efeitos farmacológicos de flavonóides necessitam de maiores elucidações. Todavia, alguns trabalhos desenvolvidos e relatados na literatura demonstram outras propriedades de grande importância para a área clínica e médica, os mesmos correspondem a ações de proteção a nível molecular, citológico e tecidual dos referidos compostos à substâncias com alta capacidade

toxicológica, assim como outras atividades a saber: capacidade antiulcerogênica, aumento da permeabilidade microvascular e diminuição da taxa de glicose no soro sanguíneo.

Flavonóides podem atuar na redução de reações que contribuem para a formação da catarata. A inibição causada por morina e quercetina extraídas de soja sobre a enzima aldose redutase “in vitro” (OLIVEIRA et al., 1997), pode ser um bom indício do uso dos mesmos como medicamentos associados ou através de uma própria dieta balanceada na prevenção da catarata.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Substâncias indutoras da hiperlipidemia

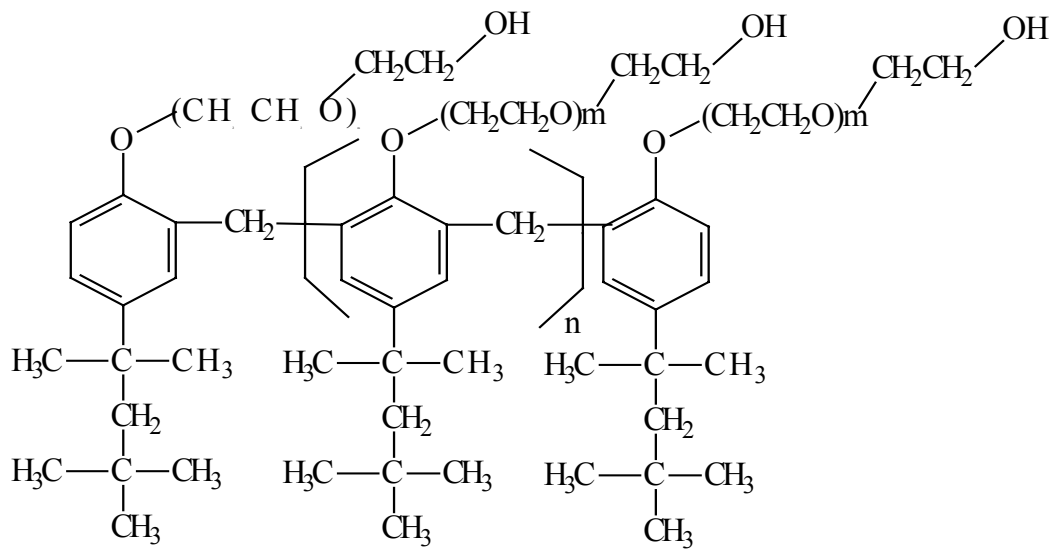
a) Triton

Triton WR 1339 conhecido como tyloxapol (Sigma), um detergente não aniônico de estrutura polimérica da Sigma, tem sido utilizado por diversos pesquisadores para induzir hiperlipidemia em animais experimentais (MATHUR et al., 1964; SIDDIQUI et al., 1996; SHARMA, 1979; CHOI et al., 1991).

b) Colesterol e ácido cólico

O ácido cólico é um metabólito do colesterol produzido pelos hepatócitos. Transportado pela bile até o intestino, o ácido cólico atua na emulsificação de gorduras facilitando sua absorção e digestão. Desta forma, associaram-se as duas substâncias na dieta dos animais para induzir a hiperlipidemia.

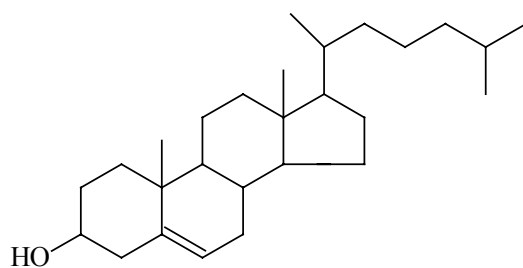
O ácido cólico da dieta tem mostrado atuar sinergicamente com o colesterol dietético para induzir o aumento dos níveis de colesterol plasmático. O ácido cólico atua aumentando a absorção de colesterol e inibe a conversão de colesterol à ácidos biliares, acarretando no aumento nos níveis de colesterol sanguíneo.



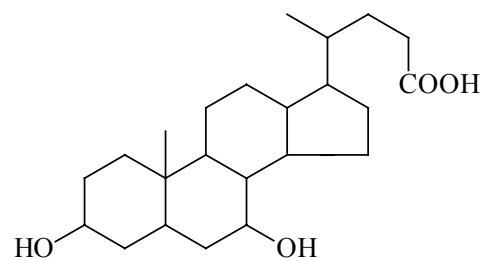
$m = 7-9$

$n < 6$

Estrutura química do Triton.



Colesterol



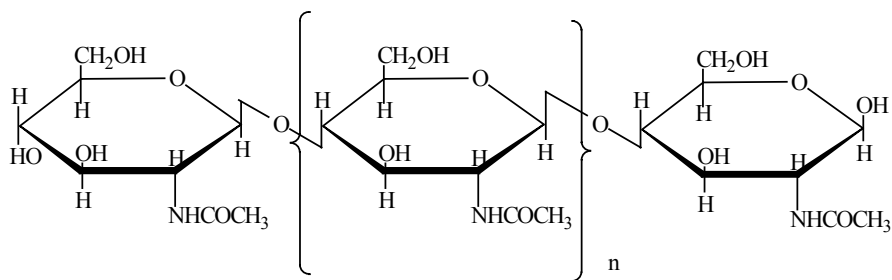
Ácido Cólico

Estruturas químicas do colesterol e do ácido cólico.

3.1.1. Substâncias testadas para redução da hiperlipidemia

a) Chitosan

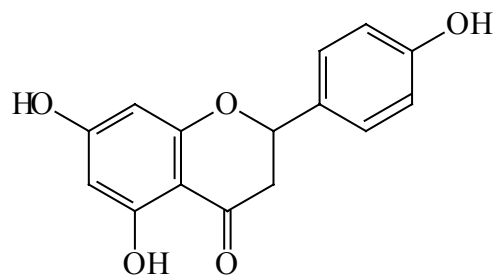
Chitosan é um biopolímero semelhante à celulose, apresentando resíduos de cadeias de N-acetyl-D-glicosamina, sendo derivado a partir da N-deacilação da quitina. A sua extração ocorre do exoesqueleto de crustáceos. Chitosan e outros derivados da quitina demonstram um futuro promissor para sua utilização devido a sua compatibilidade fisiológica em tecidos vivos. OLSEN et al. (1989) descreve algumas das aplicações biomédicas para chitosan: agente bacteriostático, hemostático, espermicida.



Estrutura química do chitosan

b) Naringenina

A naringenina é um flavanona representante da classe dos flavonóides (apresentam uma ligação saturada entre os carbonos dois e três), sendo encontrada em frutas cítricas. Uma consideração importante a ressaltar sobre as flavanonas é que de uma forma geral elas podem ser substitutas em potencial da sacarose, uma vez que através de reações químicas simples elas podem dar origem às di-hidrochalconas, que são compostos de sabor adocicado.



Estrutura química da naringenina

3.2. Primeiro ensaio biológico: efeitos de naringenina e chitosan em lipídios no soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por triton

3.2.1. Local da realização do ensaio

Todos os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Biofármacos, do Departamento de Biologia Molecular e Bioquímica, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2000.

3.2.2. Modelo experimental do primeiro ensaio biológico

No presente trabalho foram utilizados 30 coelhos machos, albinos, adultos, com peso médio (2.500 ± 200 g), com idade de 55 dias, que receberam 170 g/dia de ração comercial SOCIL e água à vontade durante todo o período experimental. Estes animais foram provenientes do Setor Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Os animais permaneceram cinco dias em gaiolas apropriadas, em área especial do laboratório de Biofármacos, com ventilação adequada para adaptação, antes de iniciar os tratamentos. Importante lembrar que tais condições foram idênticas para o segundo ensaio realizado.

Para a realização deste trabalho foram constituídos cinco grupos experimentais, escolhidos aleatoriamente, contendo seis animais cada, portanto seis repetições, que receberam os seguintes tratamentos:

Grupos	Tratamentos
1	Ração comercial
2	Ração + Triton
3	Ração + Triton + Chitosan
4	Ração + Triton + Naringenina
5	Ração + Triton + Chitosan + Naringenina

Para a indução da hiperlipidemia foi administrado, por via intraperitoneal e em dose única, Triton na dose de 300 mg/kg de peso corporal, sendo utilizado como veículo o NaCl 0,9%.

Após 20 horas da administração do Triton foram fornecidos aos coelhos, por via intraperitoneal, Naringenina na dose de 5 mg/kg de peso corporal e Chitosan na dose de 30 mg/kg de peso corporal. Para estes compostos, também foi utilizado como veículo NaCl 0,9%. Decorridos 24 horas destas administrações procedeu-se a coleta das amostras de sangue dos coelhos por punção do plexo venoso retro-orbital. As amostras foram centrifugadas à 7.100 x g, por 15 minutos, para obtenção do soro. As dosagens sorológicas, utilizando-se *kits* Laborlab, foram feitas para colesterol e triacilgliceróis segundo o método enzimático de HENRY (1982) e para colesterol-HDL seguiu-se o método de LIMA (1985). Para as quantificações utilizou-se o espectrofotômetro da marca Hitachi.

3.3. Segundo ensaio biológico: efeitos de naringenina e chitosan em lipídios no soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por colesterol e ácido cólico

3.3.1. Local da realização do ensaio

Todos os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Biofármacos, do Departamento de Biologia Molecular e Bioquímica, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2000.

3.3.2. Modelo experimental do segundo ensaio biológico

Foram utilizados 30 coelhos machos, albinos, adultos, da raça Nova Zelândia, pesando em média $2.500 \pm 200\text{g}$, com idade de 55 dias, que receberam ração comercial SOCIL na proporção de 170 g ao dia e água à vontade. Os coelhos foram organizados, aleatoriamente, em cinco grupos de seis repetições e submetidos aos seguintes tratamentos:

Grupos	Tratamentos
1	Ração comercial
2	Ração + Colesterol + Ácido Cólico (R+C+AC)
3	Ração + Colesterol + Ácido Cólico + Chitosan (R+C+AC+CH)
4	Ração + Colesterol + Ácido Cólico + Naringenina (R+C+AC+NA)
5	Ração + Colesterol + Ácido Cólico + Chitosan + Naringenina (R+C+AC+CH +NA)

Para indução da hiperlipidemia, os animais receberam colesterol 1% e ácido cólico 0,1% misturados à ração. Chitosan foi administrado na dose correspondente a 0,03% e Naringenina a 0,006% também misturados à ração. A dose de Chitosan utilizada foi definida fazendo-se comparações com doses usualmente fornecidas a seres humanos que pode chegar à 1 g ao dia. No sétimo e décimo quinto dia foram colhidas amostras de sangue, por punção do plexo venoso retro-orbital de cada coelho, que foram centrifugadas à $7.100 \times g$, por 10 minutos, para obtenção do soro. As dosagens sorológicas para colesterol e triacilgliceróis foram feitas segundo o método enzimático de HENRY (1982) e para colesterol-HDL, seguiu-se o método de LIMA (1985). Para as quantificações utilizou-se o espectrofotômetro da marca Hitachi.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Primeiro ensaio biológico

Os valores médios dos lipídios no soro sangüíneo e suas respectivas percentagens de variação encontram-se registrados nas Tabelas 1, 2, e 3 (unidade empregada é mg/dL).

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 1 observou-se que o Triton induziu a hiperlipidemia em coelhos elevando o valor das taxas sangüíneas de colesterol total de $39,42 \pm 1,94$ para $248,50 \pm 3,56$ (grupos 1 e 2), sendo que este aumento foi de cerca de 6,3 vezes. Observando-se os resultados obtidos, verifica-se que em relação aos níveis de colesterol todos os tratamentos provocaram uma redução significativa. Entretanto, o tratamento associado de chitosan e naringenina apresentou a maior percentagem de redução (73,24%).

Chitosan isolado reduziu em 52,67 % os níveis séricos de colesterol total, enquanto a naringenina atuou na diminuição em 65,61%.

O Gráfico 1 mostra os valores da percentagem da redução de colesterol, onde se evidencia que Chitosan + Naringenina, quando associados, foi o tratamento mais eficiente em reduzir os níveis de colesterol na circulação sanguínea dos coelhos hiperlipidêmicos.

Tabela 1 - Médias de colesterol total (\pm erro-padrão) em soro sangüíneo de coelhos machos hiperlipidêmicos. Viçosa-MG, 2000

Grupos e Tratamentos	Colesterol (mg/dL)	% de Variação
Ração	39,42 \pm 1,94	-
Ração + Triton	248,50 \pm 3,56 A	-
Ração + Triton +Chitosan	117,62 \pm 2,41 Ba	-52,67
Ração + Triton + Naringenina	85,47 \pm 2,28 Bb	-65,61
Ração + Triton + Chitosan + Naringenina	66,51 \pm 2,19 Bc	-73,24

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

Tabela 2 - Médias de Colesterol- HDL (\pm erro-padrão), em soro sangüíneo de coelhos machos hiperlipidêmicos. Viçosa-MG, 2000

Grupos e Tratamentos	HDL (mg/dL)	% de Variação
Ração	30,60 \pm 1,73	-
Ração + Triton	98,51 \pm 1,66 A	-
Ração + Triton +Chitosan	95,49 \pm 2,46 Aa	-3,07
Ração + Triton + Naringenina	68,67 \pm 1,59 Bc	-30,29
Ração + Triton + Chitosan + Naringenina	84,69 \pm 2,42 Bb	-14,03

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

Tabela 3 - Médias de triacilgliceróis (\pm erro-padrão), em soro sangüíneo de coelhos machos hiperlipidêmicos. Viçosa-MG, 2000

Grupos e Tratamentos	Triacilgliceróis (mg/dL)	% de Variação
Ração	100,54 \pm 0,92	-
Ração + Triton	581,96 \pm 9,52 A	-
Ração + Triton +Chitosan	262,52 \pm 4,26 Ba	-54,89
Ração + Triton + Naringenina	206,64 \pm 3,38 Bb	-64,49
Ração + Triton + Chitosan + Naringenina	166,32 \pm 2,27 Bc	-71,42

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

Conforme se observa no Gráfico 1, chitosan e naringenina, quando utilizadas isoladamente, também apresentaram uma eficiente atividade hipolipidêmica.

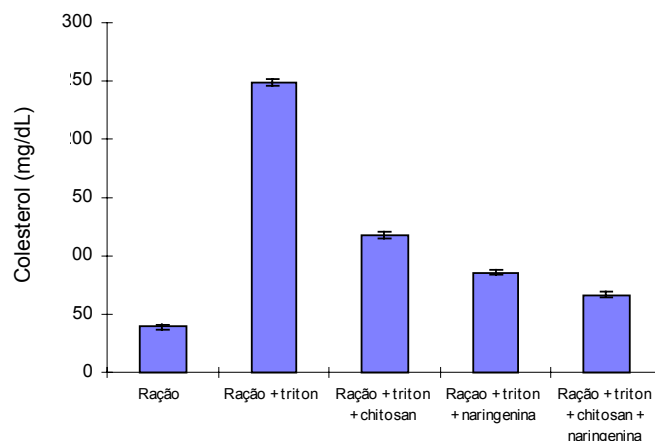


Gráfico 1 - Variação dos níveis de colesterol total (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos (teste de Dunnet), tratados por naringenina e chitosan. Viçosa-MG, 2000.

Os resultados da Tabela 2 mostram que o Triton elevou acima de três vezes os níveis de colesterol-HDL (grupos 1 e 2). Analisando-se os resultados obtidos observa-se que para os níveis de colesterol-HDL o chitosan provocou a menor percentagem de redução deste parâmetro (3,07%). Este resultado é importante na medida em que esta lipoproteína atua no transporte do colesterol dos tecidos periféricos para serem metabolizados no fígado.

Associação de chitosan e naringenina (grupo 5), reduziu em 14,03% os níveis séricos de HDL, enquanto apenas naringenina atuou na redução de 30,29%, quando comparados com o grupo tratado com ração + triton.

Comparando-se os resultados encontrados para colesterol total e colesterol-HDL, verifica-se que chitosan + naringenina não tiveram o mesmo desempenho na redução do HDL em relação ao colesterol total. Uma menor redução de HDL, conforme anteriormente abordado, é de grande importância pela atividade desta lipoproteína na remoção do colesterol da corrente sanguínea para o fígado.

O Gráfico 2 mostra os valores da porcentagem de redução do colesterol-HDL de acordo com o tratamento realizado. Verifica-se que chitosan foi o tratamento no qual ocorreu a menor redução dos níveis da lipoproteína na circulação sanguínea dos animais (-3,07%), considerando os grupos 2 e 3.

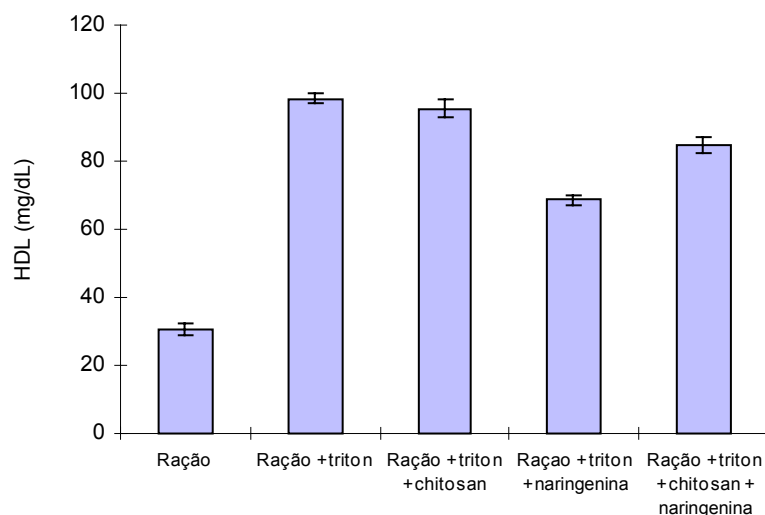


Gráfico 2 - Variação dos níveis de colesterol-HDL (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos machos (teste de Dunnet), tratados por naringenina e chitosan. Viçosa-MG, 2000.

Os valores médios obtidos para os níveis de Triacilgliceróis encontram-se registrados na Tabela 3. De acordo com os resultados observa-se o efeito sinérgico do tratamento Chitosan + Naringenina, uma vez o mesmo apresentou a maior porcentagem de redução (71,42%).

Importante ressaltar que os tratamentos com chitosan ou naringenina também foram significativos na redução dos níveis de triacilgliceróis. A Tabela 3 mostra a redução de 54,89% do constituinte para o chitosan e 64,49% para o tratamento com o flavonóide.

O Gráfico 3 representa a redução significativa (71,42%) de triacilgliceróis provocada pela ação sinérgica do chitosan e da naringenina, quando comparada com o grupo de animais hiperlipidêmicos induzidos por Triton.

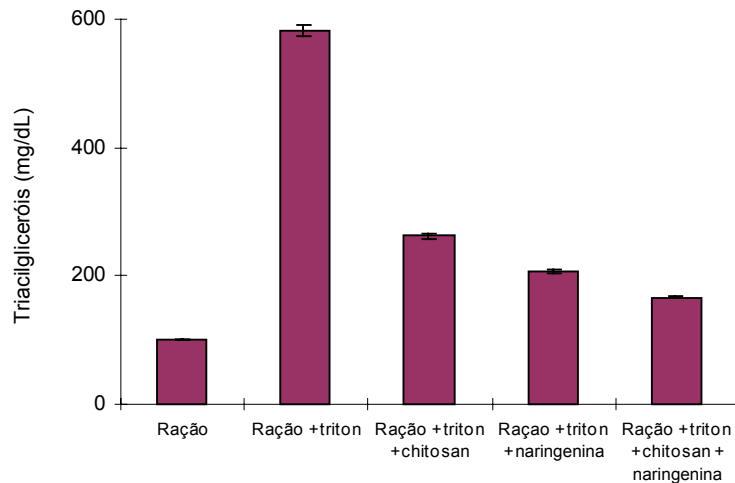


Gráfico 3 - Variação dos níveis de triacilgliceróis (mg/dL) em soro sangüíneo de coelhos (teste de Dunnet), tratados por naringenina e chitosan. Viçosa-MG, 2000.

O Gráfico 4 apresenta, em conjunto, a atividade hipolipidêmica das substâncias testadas em porcentagem. Desta forma, verifica-se que para colesterol e triacilgliceróis o efeito de redução mais acentuada foi obtido no tratamento chitosan + naringenina, 73,24% e 71,42%, respectivamente. Entretanto, considerando-se o colesterol-HDL, o chitosan obteve a menor porcentagem de redução (3,07).

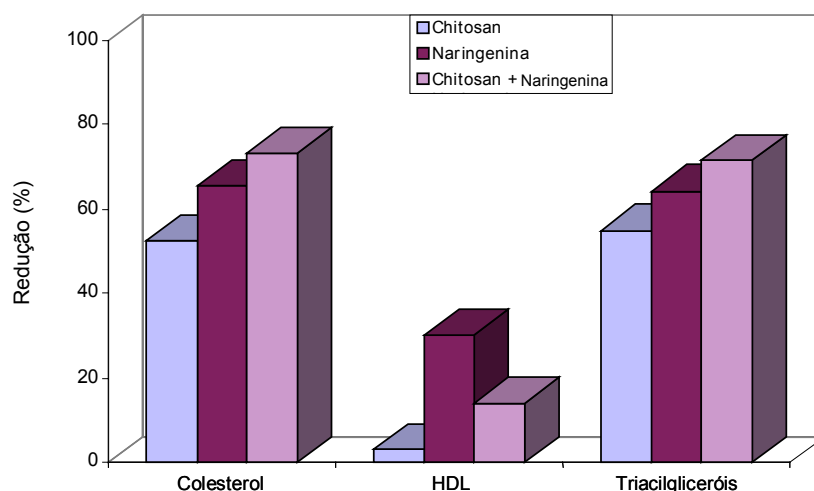


Gráfico 4 - Percentual de redução de colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis em coelhos hiperlipidêmicos tratados com chitosan, naringenina e chitosan + naringenina. Viçosa-MG, 2000.

4.2. Segundo ensaio biológico

Os resultados obtidos de colesterol, colesterol-HDL e triacilgliceróis são mostrados nas Tabelas 4, 5, 6, expressos em mg/dL, com suas respectivas percentagens de variações.

Tabela 4 - Valores médios de colesterol total no soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por colesterol + ácido cólico e suas respectivas percentagens de variação. Viçosa-MG, 2000.

Grupos e Tratamentos	7 Dias		15 Dias	
	Colesterol (mg/dL)	% Variação	Colesterol (mg/dL)	% Variação
Ração (R)	42,50 ± 1,78	-	40,65 ± 1,33	-
R+C+AC	472,49 ± 2,98B	-	482,51 ± 3,31A	-
R+C+AC+CH	420,26 ± 4,85 Ab	-11,05 *	223,50 ± 2,68 Ba	-53,68 *
R+C+AC+NA	447,61 ± 3,12 Aa	-5,27 *	228,32 ± 1,82Ba	-52,68 *
R+C+AC+CH+NA	400,48 ± 2,81 Ac	-15,24 *	184,84 ± 2,36 Bb	-61,69 *

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

Em cada grupo, A difere de B pelo teste F.

* Estatisticamente diferente do controle (ração + colesterol + ácido cólico), pelo teste de Dunnett (P < 0,05).

Tabela 5 - Valores médios de colesterol - HDL no soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por colesterol + ácido cólico e suas respectivas percentagens de variação. Viçosa-MG, 2000

Grupos e Tratamentos	7 Dias		15 Dias	
	Colesterol+HDL (mg/dL)	% Variação	Colesterol+HDL (mg/dL)	% Variação
Ração (R)	35,34 ± 1,64		32,50 ± 1,35	
R+C+AC	84,73 ± 1,44 A		128,54 ± 1,86 A	
R+C+AC+CH	82,49 ± 1,74 Bb	-2,64	108,52 ± 1,74 Ab	-15,57 *
R+C+AC+NA	84,43 ± 1,73 Bb	-0,35	103,51 ± 2,34 Aab	-19,47 *
R+C+AC+CH+NA	94,32 ± 1,22 Ba	+11,32 *	112,36 ± 2,17 Aa	-12,59 *

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

Em cada grupo, A difere de B pelo teste F.

* Estatisticamente diferente do controle (ração + colesterol + ácido cólico), pelo teste de Dunnett (P < 0,05).

Tabela 6 - Valores médios de triacilgliceróis no soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por colesterol + ácido cólico e suas respectivas percentagens de variação. Viçosa-MG, 2000

Grupos	5 Dias		15 Dias	
	Triacilgliceróis (mg/dL)	%Variação	Triacilgliceróis (mg/dL)	% Variação
Ração (R)	107,62 ± 1,59		104,52 ± 2,15	
R+C+AC	210,40 ± 1,61 A		226,46 ± 2,22 A	
R+C+AC+CH	117,43 ± 2,64 Bb	-44,19 *	125,44 ± 2,33 Ab	-44,61 *
R+C+AC+NA	151,51 ± 1,82 Aa	-27,99 *	137,51 ± 2,14 Ba	-39,28 *
R+C+AC+CH+NA	113,81 ± 2,24 Ab	-45,91**	100,51 ± 1,92 Bc	-55,62 *

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

Em cada grupo, A difere de B pelo teste F.

*Estatisticamente diferente do controle (ração + colesterol + ácido cólico), pelo teste de Dunnett (P < 0,05).

Os resultados apresentados na Tabela 4 indicam a eficiência do colesterol à 1% + ácido cólico 0,1% (Grupo 2) na indução da hipercolesterolemia, uma vez que os níveis de colesterol foram aumentados acima de dez vezes em relação ao grupo controle (Grupo 1). Ao se comparar os tratamentos efetuados do Grupo 5 com o Grupo 2, verifica-se que aos sete dias a presença do Chitosan + Naringenina reduziu os níveis de colesterol em 15,24%, embora os tratamentos contendo Naringenina e Chitosan também tenham apresentado efeitos de redução nos níveis de colesterol. Com 15 dias, a associação Chitosan + Naringenina foi a mais eficaz na redução do colesterol total (61,69%), o que evidencia a presença de um efeito sinérgico entre estas substâncias.

O Gráfico 5 mostra as variações em porcentagem dos níveis de colesterol no soro sanguíneo dos coelhos, de acordo com os grupos formados, aos 7 e 15 dias de tratamento.

O Gráfico 5 confirma que chitosan e naringenina atuando em conjunto foi o tratamento mais eficiente na redução dos níveis de colesterol no sétimo (15,25%) e décimo quinto dias (61,69%). Entretanto, os efeitos hipocolesterolêmicos dos tratamento isolados também são consideráveis, conforme mostrado na Tabela 4.

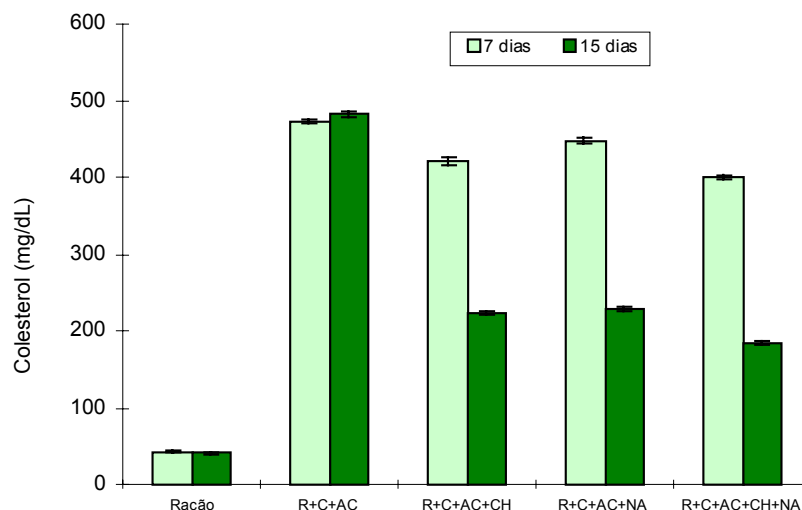


Gráfico 5 - Variação dos níveis de colesterol (mg/dL) em soro sangüíneo de coelhos, aos 7 e 15 dias. (Teste de Dunnet), tratados por naringenina e chitosan. Viçosa-MG, 2000.

Para o colesterol-HDL, a Tabela 5 mostra que o melhor resultado foi obtido também com a associação entre Chitosan + Naringenina, uma vez que o tratamento com sete dias mostrou uma percentagem de aumento do constituinte analisado (11,32%). Entretanto, o tratamento com 15 dias diminuiu os níveis do colesterol-HDL (-12,59%). Considerando que esta lipoproteína é a responsável pelo transporte do colesterol da circulação periférica para o fígado, a manutenção de níveis elevados de HDL torna-se um efeito altamente benéfico para o organismo. Uma diminuição acentuada dos níveis séricos do colesterol-HDL não se constituiria, portanto, em um efeito desejável quanto a utilização das substâncias testadas no controle hiperlipidêmico.

O Gráfico 6 mostra as variações em porcentagem dos níveis de colesterol-HDL no soro sangüíneo dos coelhos, de acordo com os grupos formados, aos 7 e 15 dias de tratamento.

Analisando-se o Gráfico 6 e os resultados apresentados na Tabela 5, verifica-se que aos sete dias o colesterol-HDL nos coelhos apresentaram poucas variações em seus níveis, com o tratamento isolado de chitosan e naringenina. Entretanto, o aumento em 11,32 % do HDL com o tratamento das duas substâncias foi estatisticamente significativo.

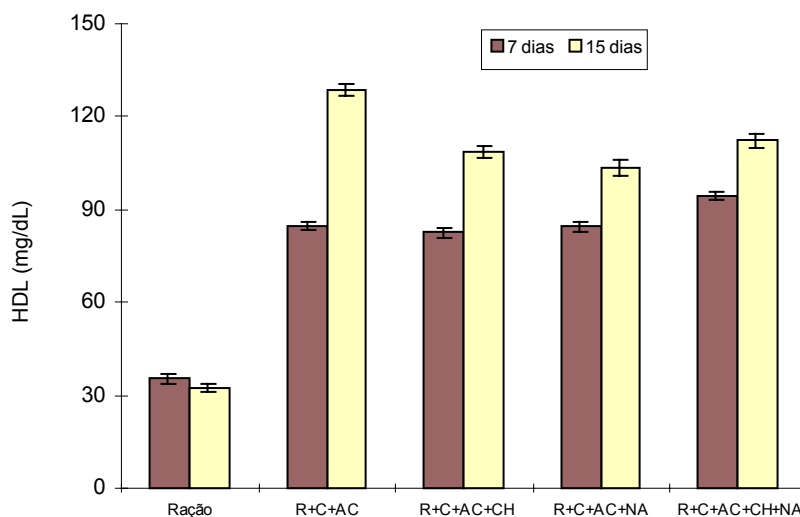


Gráfico 6 - Valores de percentagens de variação dos níveis de colesterol-HDL (mg/dL) em soro sangüíneo de coelhos, aos 7 e 15 dias (teste de Dunnet), tratados por naringenina e chitosan. Viçosa-MG, 2000.

Analisando-se os níveis obtidos com a dosagem sorológica realizada aos 15 dias, verifica-se que os níveis do constituinte diminuíram em todos os tratamentos realizados.

Em relação aos níveis de triacilgliceróis, aos sete dias de tratamento, destacaram-se os tratamentos com chitosan isolado e com chitosan + naringenina na redução do constituinte a nível sérico. Aos 15 dias todos os tratamentos foram eficazes, mas a maior percentagem de redução foi obtida ainda com a associação chitosan + naringenina (55,62%), o que evidencia novamente o efeito sinérgico entre estes compostos.

O Gráfico 7 mostra as variações em percentagem dos níveis de triacilgliceróis no soro sangüíneo dos coelhos, de acordo com os grupos formados, aos 7 e 15 dias de tratamento.

No grupo de animais que ingeriram apenas ração a variação de triacilgliceróis foi pequena, havendo inclusive uma pequena redução em seus níveis no último dia do ensaio, em comparação com o sétimo dia. O tratamento colesterol + ácido cólico elevou os valores do constituinte para valores acima de 200 mg/dL. A atividade de chitosan, naringenina, e chitosan + naringenina foram eficazes na redução dos triacilgliceróis em

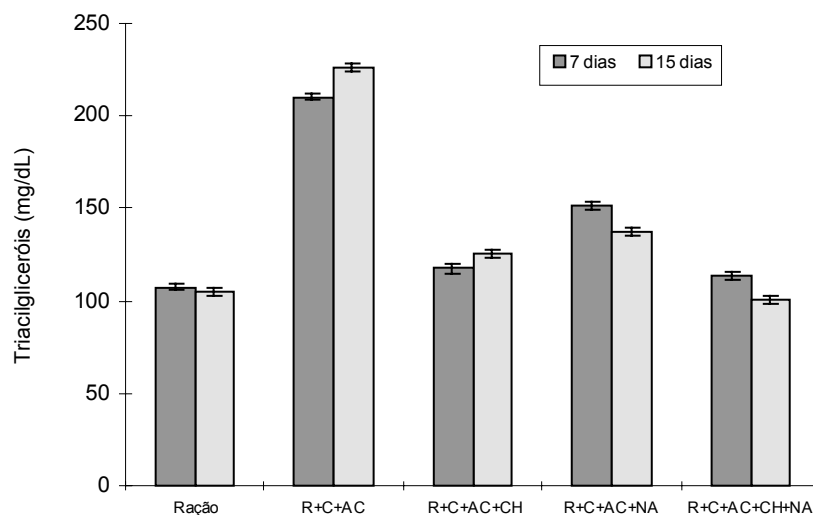


Gráfico 7 - Variação dos níveis de triacilgliceróis (mg/dL) em soro sanguíneo de coelhos, aos 7 e 15 dias (teste de Dunnet), tratados por naringenina e chitosan. Viçosa-MG, 2000.

animais que ingeriram colesterol e ácido cólico. Importante verificar que chitosan + naringenina reduziu, ao final do tratamento, o constituinte sanguíneo a níveis inferiores àqueles encontrados no grupo que ingeriu apenas ração. Os valores exatos do constituinte em mg/dL se encontram na Tabela 6.

O Gráfico 8 mostra a maior redução percentual do colesterol sérico, por efeito sinérgico, de chitosan e naringenina no sétimo e décimo quinto dias de coleta e análise sorológica dos animais (vide tabela 4 da pág. 33). Verifica-se também que naringenina com sete dias de tratamento atuou na redução em 5,27% de colesterol. Todavia, aos 15 dias de tratamento, o flavonóide aumentou sua eficiência em promover a hipocolesterolemia, uma vez que o resultado apresentado no gráfico demonstra uma atividade similar ao do chitosan. Redução de 53,68% para este e de 52,68% para a naringenina.

Com a análise do Gráfico 9 verifica-se que chitosan e naringenina produziram o menor índice de redução de colesterol HDL, quanto aos 15 dias de tratamento (-12,59%), salientando que este constituinte levou a um aumento de 11,32% no sétimo dia, conforme apresentado na Tabela 5.

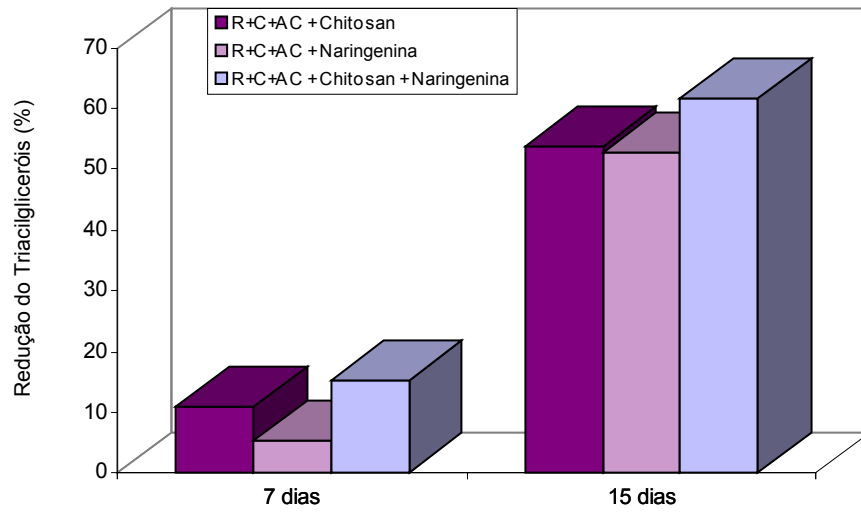


Gráfico 8 - Percentual de redução do colesterol de coelhos com hiperlipidemia induzida por colesterol e ácido cólico, tratados com chitosan, naringenina e chitosan + naringenina, aos 7 e 15 dias, Viçosa-MG (2000).

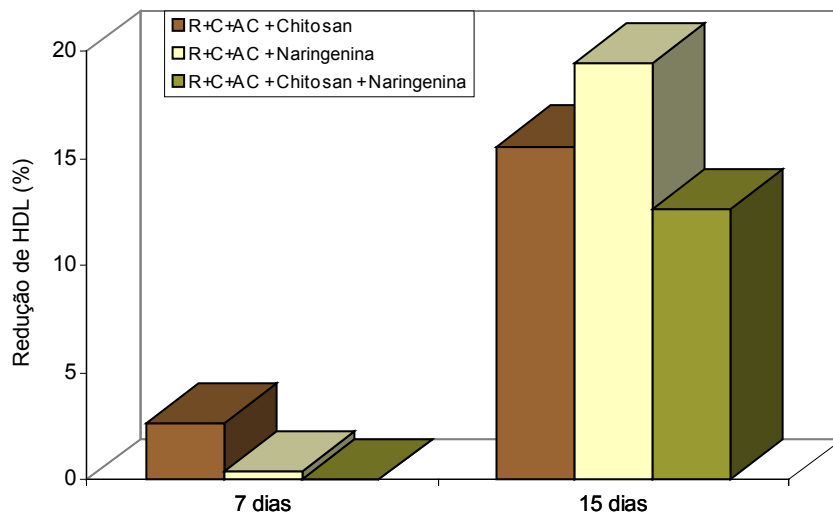


Gráfico 9 - Percentual de redução do colesterol HDL de coelhos com hiperlipidemia induzida por colesterol e ácido cólico, tratados com chitosan, naringenina e chitosan + naringenina, aos 7 e 15 dias. Viçosa-MG, 2000.

Naringenina apresentou uma grande capacidade de redução de HDL ao transcorrer do sétimo para o décimo quinto dia de tratamento. A redução exercida do flavonóide passou de 0,35% para 19,47%, ultrapassando inclusive a redução promovida pelo tratamento isolado de chitosan (-15,47%).

A análise do Gráfico 10, em conjunto com os valores médios apresentados na Tabela 6, confirma que a redução do constituinte, em 7 e 15 dias, foi maior no tratamento chitosan + naringenina, sendo que o tratamento isolado de naringenina foi o que apresentou a menor capacidade de redução. No sétimo dia de tratamento o chitosan isolado apresentava uma capacidade hipotriglicêmica semelhante ao tratamento associado com naringenina, redução de 45,91% para naringenina e de 44,19% para chitosan.

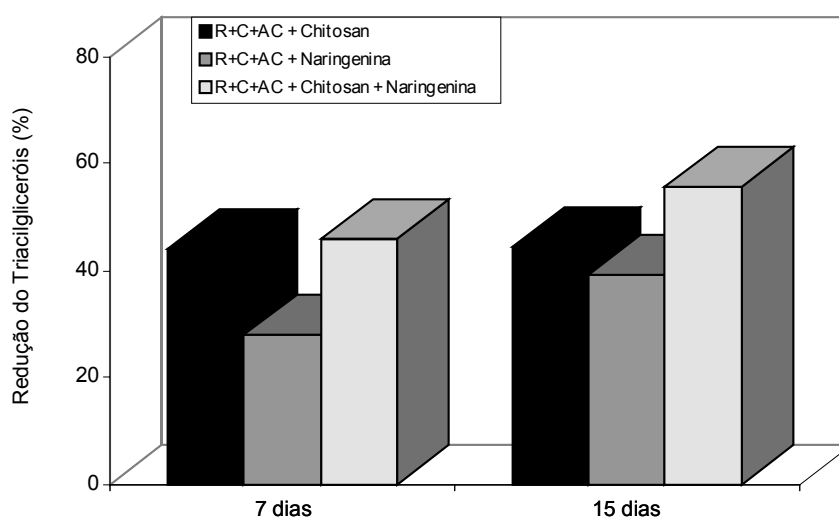


Gráfico 10 – Percentual de redução de triacilgliceróis de coelhos com hiperlipidemia induzida por colesterol e ácido cólico, tratados com chitosan, naringenina e chitosan + naringenina, aos 7 e 15 dias. Viçosa-MG, 2000.

5. DISCUSSÃO

Estudos realizados por CHOI et al. (1991) com os flavonóides catequina, prunina e 5-O-glicosil hesperetina administrados por via intraperitoneal, apresentaram para triacilgliceróis na dose de 20 mg/kg de peso corporal, redução de 20%. As mesmas substâncias, quando testadas na dose de 10 mg/kg de peso corporal, não tiveram efeitos sobre os níveis de triacilgliceróis, embora para colesterol total tenham sido reduzidos significativamente quando comparados com o grupo controle.

ITAYA et al. (1992), mostraram os efeitos dos flavonóides quercetina e taxifolina, misturados à ração, em ratos e seus efeitos hipolipidêmicos. Observou-se efeito de excreção aumentada de colesterol e ácidos biliares nas fezes quando foi adicionado quercetina à ração. Entretanto, a adição de taxifolina a 0,1% na dieta, promoveu uma redução nos níveis de colesterol, colesterol-HDL, triacilgliceróis e ácidos graxos.

KOEHRLE et al. (1986) verificaram a inibição da deiodinase iodotironina por flavonóides que convertem o hormônio T4 a T3, o metabólito mais ativo dos hormônios da tireóide. Este hormônio na lipólise do tecido adiposo inibe a fosfodiesterase, que assim aumenta os níveis intracelulares de AMPc. Este por sua vez, ativa a proteína quinase C, que atua sobre a lipase, ativando-a e ocorrendo o aumento da atividade hidrolítica dos triacilgliceróis. Considera-se ainda que o hormônio da tireóide, ao estimular o metabolismo celular, aumenta indiretamente a mobilização de gordura.

AGULLO et al. (1997) relataram a ação de flavonóides nas etapas iniciais da ação insulínica no fígado e músculo de ratas “in vivo”. A insulina tem um papel central na regulação da glicemia e atua de maneira coordenada no metabolismo lipídico e protéico. Atua em nível celular através de seu receptor transmembrana que tem atividade de tirosina quinase. Levando-se em conta que a dieta fornecida aos coelhos tem 80% de carboidratos, esta ação torna-se muito importante.

LANNI e BACKER (1985) que mostraram os efeitos de diversos flavonóides, dentre eles a naringenina, como inibidores da fosfolipase A₂ na concentração de 10⁻⁴ M, alterando o metabolismo do ácido araquidônico e inibindo a ciclooxigenase e a lipoxigenase, atuando como antiinflamatórios.

Atuando como uma fibra chitosan não é digerível e atua de forma benéfica no trato gastrointestinal. Este polissacarídeo pode reduzir a absorção de sais biliares ou colesterol, devido a tais mecanismos ocorre redução do colesterol sangüíneo (KOLDE, 1998). MAEZAKI et al. (1993), desenvolvendo um estudo preliminar em humanos constatou que uma ingestão diária entre 3 e 6 g de chitosan, durante duas semanas, resultou na diminuição de 6% do colesterol sangüíneo além de elevar em 10% o colesterol-HDL. LE HOUX et al. (1993) mostraram que chitosan inibiu a atividade enzimática da HMGCoa-redutase em fígado de ratos, com conseqüente redução da biossíntese de colesterol e ações como aumento da excreção de colesterol e ácidos biliares pelas fezes dos animais experimentais.

LE HOUX et al. (1993) relataram que o chitosan funciona como uma resina trocadora de ânions e pode se liga a ânions hidrofóbicos de ácidos biliares em pH similar àquele encontrado no trato intestinal. Esta substância mostrou propriedades hipocolesterolêmicas em ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol. Possuindo glicose em sua estrutura, se assemelha a outros carboidratos do tipo “goma guar” que é formada por polímeros de β-D-manopiranosila e cadeias laterais simples de α-D-(1-4) galactopiranosila (LEITE, 1993). A capacidade de “goma guar” em reduzir os lipídios séricos tem sido relatada por IDE et al. (1991) e EVANS et al. (1992) em animais e, em humanos por TURNER et al. (1996); TUOMILEHTO et al. (1989) e SPILLER et al. (1991). A maioria dos estudos em humanos apresenta

redução de 10 a 15% em colesterol-LDL nos tratamentos até três meses (SMITH e HOLM, 1982; TODD et al., 1990).

Naringenina e chitosan apresentaram efeitos hipolipidêmicos que podem estar associados à inibição, pelo chitosan, da HMG-Coa redutase, com conseqüente redução da biossíntese de colesterol e pela ação da naringenina que aumenta a excreção de colesterol e ácidos biliares pelas fezes dos animais experimentais. O chitosan também é capaz de exercer uma ação seqüestradora de sais biliares ao nível de tubo gastrointestinal, levando, conseqüentemente, a uma redução desses ácidos e de lipídios.

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a naringenina, o chitosan e a sua associação, foram eficazes no controle do metabolismo lipídico. Sabendo-se que os efeitos hipolipidêmicos podem ser explicados pela inibição do chitosan sobre a HMG-Coa redutase - uma enzima limitante na rota da síntese do colesterol, bem como a ação de chitosan como seqüestradora de sais biliares ao nível do tubo gastro intestinal e ação da naringenina no aumento da excreção de colesterol e ácidos biliares pelas fezes.

Pode-se concluir, também, que naringenina e chitosan, quando utilizados isoladamente, associados entre si ou com medicamentos, podem ser úteis no tratamento e prevenção de doenças causadas através da hiperlipidemia.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DA TOXICIDADE AGUDA DE RUTINA E MONASCUS SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM SORO SANGUÍNEO EM COELHOS

1. INTRODUÇÃO

Quando se realizam teste de toxicidade em animais deve-se considerar que os efeitos produzidos por um composto são aplicados à humanos. Importante também é o fato de que a exposição dos animais a um determinado agente tóxico, em diferentes doses, é um valioso e necessário método para se descobrir riscos em humanos quando estes ficarem expostos a tais agentes.

Segundo BRITO (1994), a grande quantidade de novos produtos gerados pelos centros de pesquisas enfrenta um obstáculo para a utilização dos mesmos em humanos, ou seja, a realização de testes rigorosos de toxicidade “in vivo”. Estes testes devem ser realizados em qualquer tipo de produto, sejam em medicamentos, cosméticos, defensivos agrícolas, conservantes ou germicidas de água e alimentos.

Apesar de corantes naturais não serem tão empregados como os sintéticos, por problemas econômicos e técnicos com relação à matéria prima utilizada na extração, existe a necessidade de avaliações sobre o potencial toxicológico dos mesmos e de flavonóides, uma vez que não existe um grande número de informações nesta área. O maior número de testes “in

vivo” e “in vitro” sobre corantes naturais e flavonóides estão voltados para as propriedades biológicas, principalmente atividades antioxidantes dos referidos compostos.

O objetivo deste ensaio foi a realização de um teste toxicológico de caráter subagudo, utilizando o flavonóide rutina e o corante natural monascus como substâncias – teste em coelhos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Toxicologia de flavonóides

Apesar de ensaios biológicos comprovarem a ação anticarcinogênica e antimutagênica dos flavonóides, altas concentrações de determinados flavonóides podem estar relacionadas com a indução de processos de carcinogenicidade. Todavia, FORMICA e REGELSON (1995) afirmam que apesar desses compostos poderem desempenhar atividades mutagênicas, os mesmos são considerados como substâncias essencialmente não carcinógenas. Muitos dos estudos estão relacionados, conforme se apresenta a seguir, com atividades de proteção de flavonóides contra as atividades tóxicas de outros compostos empregados em cobaias, ou seja, não há estudos voltados para se determinar o potencial toxicológico de flavonóides.

Ensaio “in vivo” utilizando-se camundongos (SADZUKA et al., 1997), por aplicação via intraperitoneal e oral de G-rutina e luteolina verificaram que estas atuaram na proteção contra a cardiotoxicidade, supressão do tecido adiposo marrom e alopecia da doxorubicina (DOX), um agente antitumoral amplamente utilizado clinicamente. Através da recuperação da atividade enzimática da glutathione peroxidase (GSHpx) e depleção da peroxidação lipídica os compostos testados diminuíram os efeitos colaterais da DOX.

IZZO et al. (1994) verificaram a proteção exercida pela quercetina, kaempferol e rutina sobre a mucosa gástrica de ratos machos contra a atividade ulcerogênica de etanol. Os autores sugerem que a redução de um fosfolípido endógeno denominado fator de agregação plaquetária (platelet-activating factor - PAF), causador de ulcerações gastrointestinais, é uma das principais razões da atividade contra processos de ulcerações nas mucosas gástricas. Associando a mesma com a capacidade de promover a diminuição da secreção de ácidos gástricos e aumento da secreção de glicoproteínas, bicarbonato de sódio, da microcirculação vascular e da síntese de prostaglandinas, notadamente as PGI₂ e PGE₂ que apresentam capacidade citoprotetora da mucosa gástrica (BOREL et al., 1987).

KUHLMANN et al. (1998) demonstraram que a quercetina, devido a sua ação antioxidante, provoca a redução da toxicidade aguda e crônica de Cisplatin [*cis*-diclorodiamina-platinum (II), CP], sobre culturas de células renais. Essa substância se caracteriza como sendo um agente antineoplásico amplamente empregado como quimioterápico no tratamento de tumores cancerígenos. Entretanto, promove a formação de radicais livres, a peroxidação de lipídios e a perda potencial das atividades metabólicas das membranas mitocondriais, acarretando uma alta nefrotoxicidade.

Os flavonóides ornitina e vicenina, isolados de folhas de uma planta indiana *Ocimum sanctum* foram testadas com o intuito de se avaliar a radioproteção das mesmas sobre camundongos expostos à radiação gama (UMA DEVI et al., 1999). No referido ensaio ambos os compostos concorreram na queda da mortalidade das cobaias, pela proteção contra síndromes gastrointestinais e da medula óssea. A aplicação das substâncias por via intraperitoneal, em concentrações de 50 microgramas/kg de peso corporal, com 30 minutos de antecedência à exposição dos animais a radiação gama, foi a metodologia que obteve os melhores resultados. Concomitantemente a esta avaliação, os autores não identificaram toxicidade aguda da ornitina e vicenina em altas dosagens (100 mg/kg de peso corporal). A capacidade antioxidante dos flavonóides testados demonstrou ser o principal mecanismo de efeito supressor das injúrias causadas pela radiação.

PETERSON e DWYER (1998), confirmam que flavonóides consumidos em uma dieta normal não demonstram toxicidade. Entretanto, existe a necessidade de estudos toxicológicos para tais substâncias quando se tem a real possibilidade de emprego dos mesmos como fármacos. Uma vez utilizados como medicamentos, muitas características quanto a farmacologia e cinética desses compostos se diferenciam no organismo, fato este que já justifica plenamente tais estudos.

2.2. Corantes naturais

Os corantes são substâncias adicionadas a uma grande diversidade de alimentos com o objetivo de conferir cor. Existem corantes sintéticos e de origem natural, sendo estes obtidos a partir de um vegetal ou eventualmente de um animal, cujo princípio do corante tenha sido isolado com o emprego de processos tecnológicos adequados (MASCARENHAS, 1997).

Relacionada com a dose empregada, muitos corantes naturais não se constituem substâncias inócuas ao organismo. Estudos desenvolvidos com corantes naturais demonstraram algumas de suas propriedades fisiológicas e farmacológicas (VALENTE, 1998).

Corantes naturais como o urucum, cúrcuma, carmim, vermelho de beterraba, páprica, antocianinas (classificadas como flavonóides), clorofila e monascus são amplamente utilizadas na indústria de alimentos.

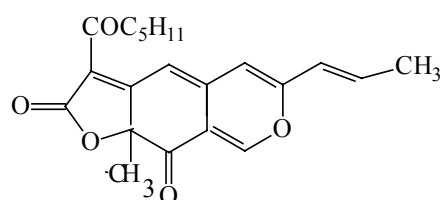
2.3. *Monascus*

Monascus é um corante originário e amplamente utilizado nos países asiáticos. Apresentando uma coloração que varia do vermelho ao laranja, esse corante é empregado para produzir coloração e como condimentos em alimentos como carnes, peixes, bebidas e sorvetes.

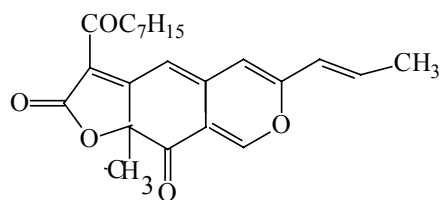
Sendo produzido pela fermentação do arroz por fungos do gênero *Monascus*, resulta-se na formação dos “red rice” ou red “kojic rice” seguido por um processo de purificação. As duas espécies mais utilizadas são *Monascus purpureus* e *Monascus anka* (MASCARENHAS, 1997). Os pigmentos monascorubrina, rubropunctamina, monascina e ankaflavina são

considerados como aqueles produzidos biossinteticamente, enquanto a monascorubramina e rubropunctamina são considerados como derivados aminados dos dois primeiros pigmentos citados (FIELDING et al., 1961). A seguir são apresentadas as estruturas químicas dos pigmentos produzidos pelos fungos do gênero *Monascus* (Figura 1).

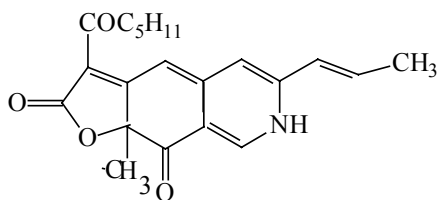
Importante salientar que o corante empregado no teste é constituído do conjunto de todos os pigmentos apresentados a seguir, sendo que não há uma identificação quantitativa de cada pigmento presente no corante, assim como não existem informações sobre as propriedades farmacológicas e/ou toxicológicas de cada pigmento isolado.



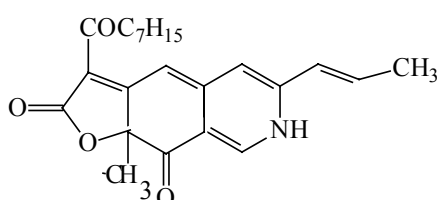
Rubropunctatina
(vermelho)



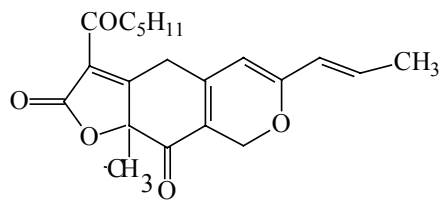
Monascorubrina
(vermelho)



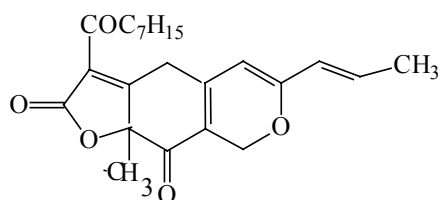
Rubropunctamina
(violeta)



Monascorubramina
(violeta)



Monascina
(amarelo)



Ankaflavina
(amarelo)

Figura 1 - Estrutura dos pigmentos produzidos pelo gênero *Monascus*.

2.3.1. Propriedades toxicológicas do *Monascus*

BLANC et al. (1995) evidenciaram que um metabólito denominado de monascidina A é produzido juntamente com a produção do corante. Essa substância é estruturalmente idêntica a citrinina, uma micotoxina.

Um método de alta sensibilidade utilizando-se de HPLC foi desenvolvido para se analisar a contaminação por citrinina desses corantes que são produzidos (VILAR et al., 1999). A detecção alcançada variou entre 0,2 e 17,1 µg/g. Os mesmos autores avaliaram a mutagenicidade com amostras comerciais de *Monascus* e compararam os resultados obtidos com a citrinina. Os resultados apontam que para haver uma ação mutagênica da citrinina, faz-se necessário uma complexa biotransformação celular de tal composto, o que acarreta em um risco muito pequeno de ocorrência de mutagenicidade.

Avaliações “in vitro” da genotoxicidade de extratos de arroz fermentado por *Monascus purpureus* foram efetuadas por JAHN (1991). O autor relata que os extratos não apresentaram genotoxicidade significativas.

Devido à pequena genotoxicidade e mutagenicidade apresentadas por extratos de *Monascus purpureus*, em comparação aos compostos nitrosos oriundos de carne curada (FINK-GREMMELS et al., 1991), acredita-se que aqueles possam ser uma excelente alternativa de uso em substituição aos nitritos, empregados na industrialização de produtos cárneos para originar coloração avermelhada aos mesmos.

2.3.2. Propriedades farmacológicas do *Monascus*

FINK-GREMMELS et al. (1989) verificaram a ação antibacteriana na substituição de nitritos e nitratos em salsichas por *Monascus*; a inibição do desenvolvimento dos microrganismos foi eficiente para *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*.

FINK-GREMMELS e LEISTNER (1989), avaliaram os pigmentos produzidos por *M. purpureus* em relação a suas propriedades toxicológicas e na redução dos níveis de colesterol em ratos. Os animais hiperlipidêmicos

(indução realizado por dieta), apresentaram redução dos níveis de colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis plasmáticos. Não se verificou toxicidade sobre as cobaias utilizando-se 5 e 10 g/kg de peso corporal do extrato de pigmentos.

Atividades antioxidantes de extratos de *Monascus anka* “in vitro” e “in vivo” foram verificadas sobre o radical livre 1,1 difenil-2-picrylhydrazyla (DPPH) e sobre a peroxidação de lipídios em microsomas de fígados de ratos (ANIYA A et al., 1999). Injúrias hepáticas foram promovidas em ratos através dos agentes químicos Galactosamina (GalN, 400 mg/kg) e GalN plus lipopolysaccharida (LPS, 0,5 microg/kg) aplicados intraperitonealmente. A redução da hepatotoxicidade causada por tais agentes foi verificada pela diminuição das atividades enzimáticas das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e glutathione S-transferase (GSH), que estão ligadas a processos de estresse oxidativo. A ação descrita foi verificada quando houve aplicações de extratos preparados de *Monascus anka* com 1 e 15 horas antes do fornecimento das drogas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local da realização do ensaio biológico

O ensaio biológico e as dosagens bioquímicas deste trabalho foram realizados no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2000.

3.2. Descrição dos objetivos e caracterização do tipo de ensaio realizado

BRITO (1994) afirma que o estudo de toxicidade aguda com doses repetidas (teste subagudo) vem a ser uma “avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de uma substância, fornecendo informações acerca dos riscos para a saúde, resultantes de uma exposição de doses repetidas, pela via selecionada, mas de curta duração”. Outro importante objetivo da realização de um teste de toxicidade subaguda é a obtenção de resultados que possam ser empregados para delimitar doses para estudos de toxicidade subcrônica e outros estudos toxicológicos, podendo fornecer informações iniciais do modo de ação tóxica da substância-teste.

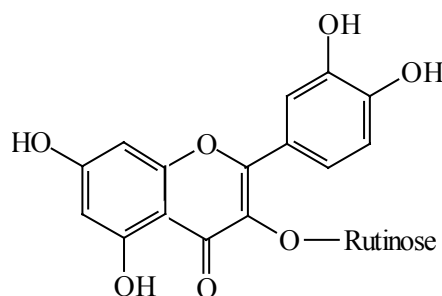
Desenvolveu-se o teste de toxicidade subaguda, com doses repetidas, em coelhos da raça Nova Zelândia. Considerando-se três níveis diferentes de doses para cada substância-teste (20, 40 e 60 mg de rutina e 40, 80 e 100 mg de monascus). Esta modalidade de ensaio toxicológico visa

primordialmente a obtenção de informações sobre os possíveis efeitos toxicológicos de uma substância química, após a administração repetida por uma via selecionada às cobaias. A partir destes ensaios, pode-se realizar uma estimativa preliminar das propriedades toxicológicas das referidas substâncias no metabolismo lipídico, de proteínas, de carboidratos e de minerais.

3.3. Substâncias testadas

a) Rutina

Rutina é um flavonóide pertencente ao grupo dos flavonóis, sendo que juntamente com a quercetina, se constitui no flavonóide com o maior número de estudos direcionados para a verificação de suas propriedades farmacológicas.



Estrutura química da rutina.

b) Monascus

O corante utilizado estava na forma de pó fino na forma utilizada para preparação de alimentos. Esta substância fornece uma coloração vermelha característica, a qual é resultado da fermentação do amido de arroz pelo microrganismo *Monascus purpureus* ou *Monascus anka*. Monascus constitui-se num preparado que é geralmente no tempero de alimentos numa proporção de 0,5 - 1 g/kg. As estruturas químicas destes corantes foram demonstradas anteriormente.

3.4. Divisão dos animais conforme o tratamento empregado

Foram utilizados para este ensaio 70 coelhos da raça Nova Zelândia, sendo 35 machos e 35 fêmeas. Todos os animais foram provenientes do setor de cunicultura da Universidade Federal de Viçosa. Todos os animais possuíam idade de 55 dias no início do ensaio.

Os animais foram divididos em dois grupos: o primeiro de machos e o segundo de fêmeas. Deste conjunto foram formados grupos de acordo com o nível da dose das substâncias-teste empregada, assim como o grupo controle. Cada grupo foi constituído por cinco machos e cinco fêmeas adultos e sadios (ver tabela abaixo). Torna-se importante ressaltar que a divisão dos animais para formação dos grupos ocorreu aleatoriamente, ao acaso, como mostrado abaixo.

Grupos	Fêmeas	Machos	Substâncias e Doses Empregadas
1	5	5	RUTINA: 20 mg
2	5	5	RUTINA: 40 mg
3	5	5	RUTINA: 60 mg
4	5	5	MONASCUS: 40 mg
5	5	5	MONASCUS: 80 mg
6	5	5	MONASCUS: 100 mg
7	5	5	CONTROLE (somente ração)

3.5. Acomodação e alimentação dos animais

Os animais foram dispostos em gaiolas individuais. A temperatura local do ensaio ficou em torno de 22 ± 3 °C; a taxa de umidade relativa do ar ficou situada em torno de 70%. Períodos de claro e escuro obedeceram a ciclos regulares de 12 horas conforme recomendado por BRITO (1994).

O regime alimentar se constituiu de água potável “ad libitum” e ração comercial Socil, fornecendo-se uma quantidade de 120 gramas/dia por animal.

3.6. Descrição da Raça Nova Zelândia

Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia são muito empregados em cruzamentos e para criações de raça pura e devido a sua rusticidade e resistência a doenças esses animais são empregados para ensaios biológicos.

Apesar do nome, a raça Nova Zelândia teve sua origem nos Estados Unidos, sendo a mais cosmopolita das raças de coelhos no mundo. Proveniente do cruzamento de diversas raças de coelhos brancos americanos, esta raça apresenta três variedades de cor de pelagem: branca, vermelha e preta. Entretanto, as variedades vermelha e preta são pouco difundidas, em contrapartida a branca é a mais criada no mundo (MELLO, 1989).

A linhagem, sexo e a idade interferem nos níveis de colesterol em coelhos. FEKETE (1991), comprovou a propensão de alta colesterolemia promovida em coelhos, a partir de uma dieta rica em colesterol, e que esses roedores são úteis como modelos de estudo do metabolismo de colesterol.

Ao nascerem, os níveis de colesterol nos coelhos se aproximam daqueles encontrados em indivíduos adultos. O ápice colesterolêmico se encontra aproximadamente aos 25 dias de idade, posteriormente esses valores diminuem até os níveis encontrados em adultos entre os 60 e 80 dias de vida (LAIRD e FOX, 1970).

A digestão de lipídios é realizada no intestino delgado, neste processo a liberação dos ácidos graxos das moléculas dos triacilgliceróis chega ao final pela atividade das lipases liberadas pelo pâncreas. A bile produzida no fígado é segregada no duodeno através do ducto biliar, apresentando sais biliares que emulsionam as gorduras e participam na absorção das gorduras. Ácidos graxos, sais biliares e outros produtos lipossolúveis se agregam em micelas que transportam as gorduras até as membranas plasmáticas onde ocorre a absorção. Os ácidos graxos insaturados consumidos são hidrogenados, sendo convertidos em ácidos graxos saturados, que determinam o alto valor de ácidos graxos saturados nesses animais (MELLO, 1989).

Estudos parecem indicar que as inter-relações entre o conteúdo de colesterol, ácidos graxos saturados e poliinsaturados na carne de coelho pode apresentar um efeito menor na colesterolemia em humanos do que para outros tipos de carnes vermelhas. Além disso, substâncias presentes na ração como saponinas, flavonóides e fibras são responsáveis por menores níveis de colesterol (CHEEKE, 1987).

Na espécie humana os níveis lipídicos normais podem ser alterados em desordens cardíacas, diabetes, hipotireoidismo, moléstias do trato biliar, hepatite tóxica e virótica, pneumonia, febre tifóide e tuberculose (LIMA, 1985).

3.7. Metodologia empregada

Após um período de adaptação de sete dias às condições locais do ensaio, os animais foram expostos às substâncias-teste, com suas respectivas doses, sete dias por semana durante 28 dias. A aplicação foi por via oral através de cápsulas contendo a concentração exata de flavonóide ou corante a ser ingerido pelo animal. Cada animal pertencente a cada grupo recebia uma cápsula diariamente às 9 horas da manhã e em jejum. Após a vigésima oitava aplicação das cápsulas, esperou-se o intervalo de 24 horas para a coleta de sangue seguido pela análise bioquímica. Os animais se encontravam em jejum na retirada das amostras sangüíneas.

Estipulou-se dois tempos para a realização da coleta de sangue bem como a realização das análises sorológicas: tempos 0 (zero) e final (após o 28º dia de tratamento). O tempo zero compreendeu o momento da primeira coleta de sangue individual dos animais, após o período de adaptação dos mesmos e sem a administração das substâncias a serem testadas. Esta coleta teve o objetivo de verificar a existência de alterações nos níveis normais dos constituintes nos animais. O mesmo procedimento foi realizado no tempo final do ensaio biológico. Desta forma, foi possível detectar as variações causadas pelos tratamentos. Em ambos os tempos do ensaio, os animais foram pesados.

O sangue coletado pelo plexo venoso retro-orbital de cada animal foi centrifugado em Centrifugador Excelsa 2, modelo 205 N em 7.100 g durante

15 minutos. Desta forma se obteve o soro a ser utilizado no equipamento Alizê, que realizou as dosagens bioquímicas através de Kits da marca Biolab.

3.8 Dosagens bioquímicas

As dosagens sorológicas foram efetuadas no equipamento de dosagens multiparamétrico de Bioquímica (Alizê). O mesmo realiza as leituras em tempos determinados a uma temperatura de 37° C, após realizar a mistura de alíquotas do soro com os reagentes específicos utilizados para a dosagem de cada constituinte.

As seguintes análises séricas foram realizadas: Colesterol total, colesterol-HDL, triacilgliceróis, albumina, proteínas totais, creatinina, uréia, ácido úrico, bilirrubina direta, bilirrubina total, alanina aminotransferase (TGP), aspartato aminotransferase (TGO), gama-glutamyl-transferase (gama-GT), cálcio, cloro, fósforo e glicose.

3.9. Análise estatística

O experimento foi instalado no delineamento inteiramente ao acaso, com sete tratamentos (G1 = ração, G2 = ração + 20 mg de rutina, G3 = ração + 40 mg de rutina, G4 = ração + 60 mg de rutina, G5 = ração + 40 mg de monascus, G6 = ração + 80 mg de monascus e G7 = ração + 100 mg de monascus), em cinco repetições, avaliadas aos 0 e 28 dias.

Foram mensurados ganho de peso, colesterol total e colesterol-HDL, triacilglicerol, albumina, creatinina, uréia, ácido úrico, glicose, gama-GT, bilirrubina direta e total, cloro, proteína, TGO, TGP, fósforo e cálcio, em machos e fêmeas separadamente.

Os dados foram submetidos à análise de variância e teste F ($P < 0,05$ e $P < 0,01$). O efeito de tempo e de sexo foi analisado por meio do teste F, a 1 e 5% de probabilidade.

As doses de rutina e de monascus foram testadas por meio de análise de regressão. Neste caso, a equação que melhor se ajustou aos dados foi escolhida com base no coeficiente de determinação (R^2) e na significância

dos coeficientes de regressão por meio do teste t ($P < 0,05$ e $P < 0,01$). Quando não houve efeito significativo das doses sobre o constituinte estudado, optou-se por apresentá-lo graficamente através da média geral e, quando não foi possível o ajuste de equações, optou-se por apresentar as médias observadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apresentam-se, a seguir, os resultados obtidos no ensaio biológico, em forma de tabelas e gráficos.

A discussão das tabelas foi feita para cada parâmetro avaliado, em relação aos grupos formados, a partir dos tratamentos de rotina e monascus, submetidos aos animais nos tempos 0 (zero) e final, ou seja, após 28 dias.

A discussão dos gráficos se fundamenta sobre equações ajustadas para o tratamento de rotina e monascus, aos animais machos e fêmeos, após os tratamentos. Estas equações foram utilizadas para a montagem dos gráficos. Por meio destas mesmas equações pode-se calcular as maiores e menores médias estimadas dos parâmetros avaliados de acordo com a substância-teste utilizada.

Fatores como a linhagem, a idade, a alimentação e o sexo dos animais, assim como as condições ambientais e as variáveis analíticas influenciam no resultado final de estudos bioquímicos. Portanto, é fundamental considerar os valores encontrados nos grupos-controle, uma vez que muitos dos valores normais encontrados em coelhos ainda não estão padronizados internacionalmente e, ou, podem variar pelos fatores citados acima. Entretanto, constituintes que já apresentam citações na literatura em relação aos seus níveis normais podem ser utilizados como parâmetros sem, todavia, superestimar estes dados e subestimar os valores encontrados nos grupos-controle do ensaio realizado.

Existem diferenças nos níveis bioquímicos entre análises sorológicas e plasmáticas. O procedimento das técnicas utilizadas para coleta e preparo das amostras pode influenciar no resultado final.

Importante a ressalva que constituintes bioquímicos, quando alterados, podem indicar estados patológicos e lesões em órgãos importantes para o bom funcionamento do organismo, tais como: fígado, rins, pâncreas, dentre outros. Desta forma, estudos bioquímicos de constituintes como cloretos, fósforo, cálcio, bilirrubina, creatinina e uréia são bons indicadores de possíveis efeitos toxicológicos de medicamentos ou outras substâncias em nível histológico.

4.1. Apresentação e discussão dos parâmetros analisados

- Ganho de peso

A Tabela 1 indica que o ganho de peso entre os grupos formados não apresentou variações estatisticamente significativas ($P > 0,05$). Desta forma, conclui-se que os tratamentos não afetaram o ganho de peso dos animais.

Analisando-se o Gráfico 1 referente às estimativas de ganho de peso, verificou-se que os tratamentos com a rutina e monascus não interferiram neste parâmetro analisado, uma vez que em todos os grupos formados os animais mantiveram as mesmas estimativas. Para rutina, os machos apresentaram a mesma média de 665,00 gramas, sendo que as fêmeas apresentaram uma média de ganho de peso de 653,00 g. Machos tratados com o corante monascus, assim como o grupo-controle, manteve a estimativa de ganho de peso de 636,75 g, enquanto as fêmeas apresentaram o valor de 622,20 g.

- Colesterol total

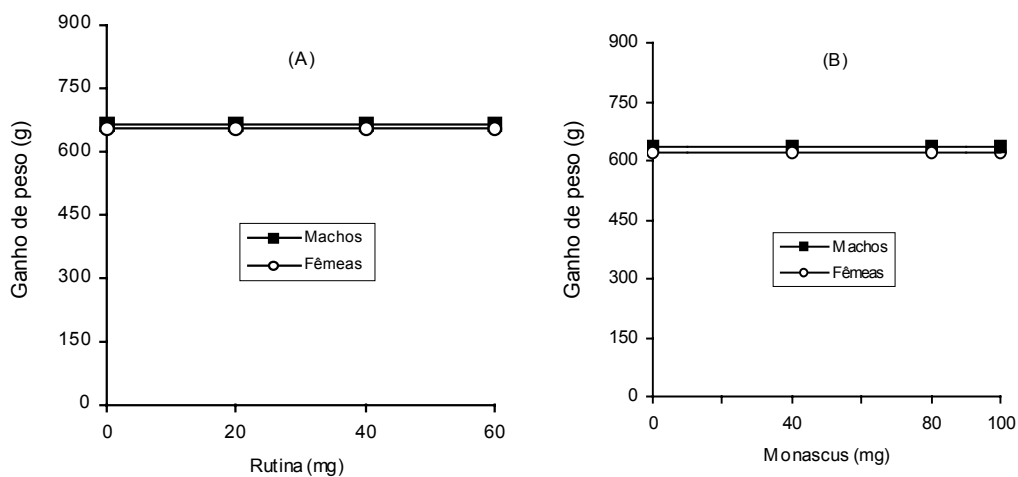
Foi verificada uma diferença significativa ($P < 0,05$) para o colesterol total em todos os grupos e tempos de fêmeas, enquanto os machos não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$). Níveis séricos de colesterol foram maiores em fêmeas (Tabela 1).

Tabela 1 – Ganho de peso, colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis de machos e fêmeas de coelho tratados com diferentes doses de rutina e de monascus

Grupos	Tempo (Dias)	Ganho de peso (g)		Colesterol (mg/dL)		Colesterol-HDL (mg/dL)		Triacilgliceróis (mg/dL)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Ração	0			72,94 Ba	156,58 Aa	35,64 Aa	43,40 Aa	134,40 Aa	152,80 Aa
	28	660,00 A	670,00 A	71,04 Ba	164,98 Aa	33,76 Ba	44,28 Aa	134,44 Aa	152,00 Aa
Ração + 20 mg de rutina	0			72,00 Ba	166,00 Aa	37,06 Aa	40,96 Aa	142,00 Aa	149,02 Aa
	28	683,00 A	670,00 A	64,78 Ba	113,04 Ab	26,06 Ab	34,18 Aa	119,66 Aa	120,56 Aa
Ração + 40 mg de rutina	0			72,04 Ba	152,00 Aa	35,56 Aa	37,44 Aa	134,80 Aa	150,00 Aa
	28	683,00 A	642,00 A	73,44 Ba	115,24 Ab	33,25 Aa	37,40 Aa	145,62 Aa	119,44 Aa
Ração + 60 mg de rutina	0			70,02 Ba	161,20 Aa	35,98 Aa	33,72 Aa	116,98 Ba	154,00 Aa
	28	634,00 A	632,00 A	66,42 Ba	111,92 Ab	38,40 Aa	38,42 Aa	135,16 Aa	99,60 Bb
Ração + 40 mg de monascus	0			74,30 Ba	165,12 Aa	30,24 Aa	37,94 Aa	141,20 Aa	151,40 Aa
	28	746,00 A	692,00 A	58,54 Ba	111,52 Ab	30,52 Aa	38,68 Aa	133,16 Aa	104,46 Ab
Ração + 80 mg de monascus	0			72,80 Ba	155,62 Aa	29,28 Ba	41,24 Aa	132,80 Aa	148,00 Aa
	28	537,00 A	560,80 A	64,22 Ba	141,94 Aa	29,12 Ba	49,32 Aa	135,80 Aa	112,08 Ab
Ração + 100 mg de monascus	0			73,02 Ba	162,60 Aa	35,60 Aa	41,96 Aa	135,40 Aa	155,40 Aa
	28	604,00 A	566,00 A	64,32 Ba	134,78 Ab	26,70 Bb	39,66 Aa	133,60 Aa	110,76 Ab

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

Em cada característica, cada grupo e cada sexo (coluna), a difere de b pelo teste F (P < 0,05).



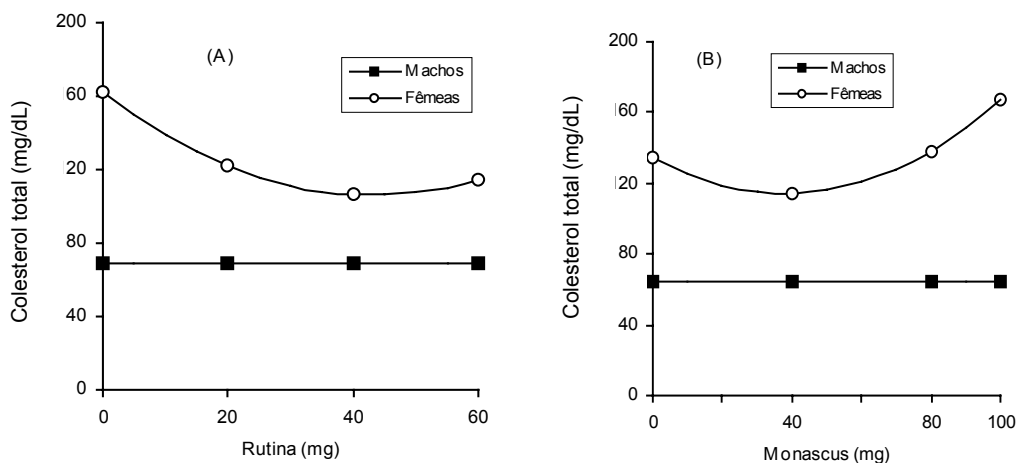
Rutina, machos: $\bar{Y} = 665,00$ g

Rutina, fêmeas: $\bar{Y} = 653,50$ g

Monascus, machos: $\bar{Y} = 636,75$ g

Monascus, fêmeas: $\bar{Y} = 622,20$ g

Gráfico 1 - Estimativa do ganho de peso de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).



Rutina, machos: $\bar{Y} = 68,92$ mg/dL

Rutina, fêmeas: $\hat{Y} = 161,9970 - 2,6082 \cdot Ru + 0,03039 \cdot Ru^2$ $R^2 = 0,91$

Monascus, machos: $\bar{Y} = 64,53$ mg/dL

Monascus, fêmeas: $\hat{Y} = 134,038 - 1,0547 \cdot Mo + 0,01384 \cdot Mo^2$ $R^2 = 0,98$

Gráfico 2 - Estimativa do colesterol total de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

Quando se comparou machos, em todos os grupos, nos tempos inicial e final do ensaio, observou-se que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas. Entretanto, fêmeas apresentaram reduções estatisticamente significativas em quase todos os grupos submetidos aos tratamentos das substâncias, exceção feita ao grupo Ração + 80 mg de monascus.

Torna-se relevante salientar que os coelhos estavam entrando em puberdade. Desta forma, o colesterol sintetizado em seus organismos tem várias rotas metabólicas a seguir, sendo que as principais são a síntese dos sais biliares e a dos hormônios esteroidais.

Uma fêmea possui quatro ou cinco glândulas mamárias, distribuídas aos pares, situando-se da região torácica à ingüinal. As glândulas localizadas na região abdominal são as mais produtivas. O início do desenvolvimento dessas glândulas é embrionário, apresentando seu ápice de desenvolvimento após a puberdade do animal, devido à ação dos hormônios estrógenos e da progesterona (MELLO, 1989). Parte do colesterol é empregado nestas produções de hormônio, motivo pelo qual se justifica o maior valor de colesterol nas fêmeas em comparação com os machos.

Observou-se que o colesterol foi reduzido em todas as fêmeas dos grupos tratados, evidenciando-se uma capacidade hipocolesterolêmica nestes animais, embora nos machos não foi observado o mesmo desempenho das substâncias. A redução dos níveis do constituinte em discussão em coelhas se torna mais relevante quando se observa, conforme é apresentado, posteriormente, que não ocorreram variações estatisticamente significativas do colesterol-HDL, fazendo com que se presuma que o colesterol reduzido foi aquele de efeitos aterogênicos.

O Gráfico 2 demonstra que os grupos de machos em todas as doses não variaram seus valores médios de colesterol total. Animais machos tratados com rotina obtiveram colesterol médio de 68,92 mg/dL. Machos dos grupos que foram submetidos a monascus mantiveram para colesterol total níveis séricos em 64,53 mg/dL.

Fêmeas do grupo-controle de rotina apresentaram o maior valor calculado no nível sérico de colesterol total (162,00 mg/dL). Estima-se que o mesmo flavonóide se aplicado durante 28 dias numa dose de 42,91 mg

acarretaria numa menor estimativa de colesterol, numa concentração média de 106,04 mg/dL.

Monascus também fez com que houvesse alterações de acordo com a dose aplicada nas fêmeas após o tratamento, 100 mg de monascus elevou o colesterol total dos animais para 166,97 mg/dL enquanto doses estimativas de 38,10 mg do corante reduziria o constituinte para 113,94 mg/dL.

- Colesterol-HDL

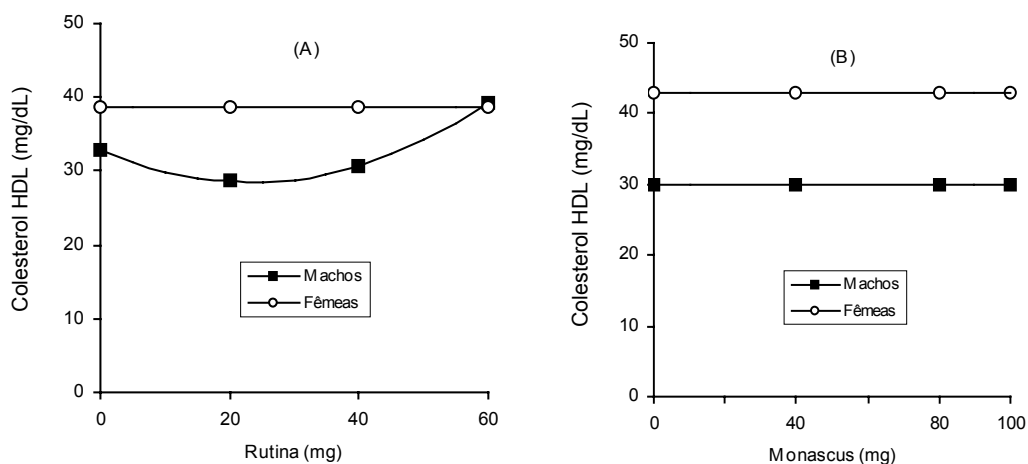
As fêmeas não apresentaram alterações significativas de colesterol-HDL, quando se comparou os tempos 0 e 28 dias. Os coelhos machos apresentaram reduções estatisticamente significativas do constituinte no grupo tratado com rutina a 20 mg por dia, assim como no grupo tratado com 100 mg de monascus.

Quando se compararam os sexos, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas, como mostradas na Tabela 1, no grupo-controle (ração) ao fim do tratamento; no grupo tratado com ração + 80 mg de monascus (nos dois tempos considerados) e ração + 100 mg de monascus aos 28 dias, em todos os grupos citados os machos apresentaram níveis séricos de colesterol-HDL inferiores aos das fêmeas.

Faz-se necessária a realização de estudos dos mecanismos de ação das substâncias testadas no metabolismo de lipídios e nos demais constituintes mensurados neste ensaio, uma vez que os dados sobre este assunto são escassos na literatura.

A análise do Gráfico 3 indica que não ocorreram variações de colesterol HDL para machos e fêmeas tratados com monascus em nenhuma dose. Para os machos, verificaram-se valores médios de 30,03 mg/dL e 42,99 mg/dL em fêmeas.

Rutina também não atuou em flutuações do HDL em fêmeas, os animais de todos os grupos mantiveram uma média de colesterol-HDL de 38,57 mg/dL. Entretanto, o mesmo não foi observado em indivíduos machos, pois uma dose de 60 mg do flavonóide elevou o constituinte para uma média máxima de 39,25 mg/dL, enquanto estima-se que uma dose de 23,43 mg reduziria o HDL para um nível de 28,51 mg/dL.



$$\text{Rutina, machos: } \hat{Y} = 32,9135 - 0,3763Ru + 0,008031 * Ru^2 \quad R^2 = 0,82$$

$$\text{Rutina, fêmeas: } \bar{Y} = 38,57 \text{ mg/dL}$$

$$\text{Monascus, machos: } \bar{Y} = 30,03 \text{ mg/dL}$$

$$\text{Monascus, fêmeas: } \bar{Y} = 42,99 \text{ mg/dL}$$

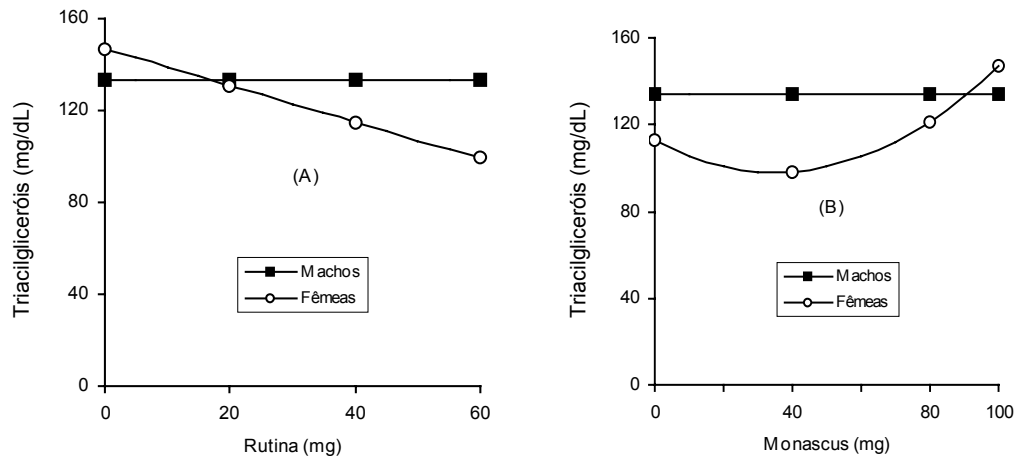
Gráfico 3 – Estimativa do colesterol HDL de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

- Triacilgliceróis

Níveis sanguíneos de triacilgliceróis mostraram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$), comparando sexos distintos, nos grupos de animais tratados com rutina na dose de 60 mg diárias. Importante ressaltar que flavonóide diminuiu os níveis de triacilgliceróis em fêmeas (154,00 a 99,60) ao final do tratamento (Tabela 1).

Rutina, na dose de 60 mg, e todos os grupos tratados com monascus, apresentaram variações estatisticamente significativas para fêmeas, ocorrendo diminuição de triacilgliceróis nesses animais ao término do ensaio (Tabela 1).

Os níveis séricos de triacilglicerol em machos tratados com rutina e monascus apresentaram uma manutenção em suas médias ao longo das doses do tratamento efetuado. Para animais submetidos ao tratamento com o flavonóide o valor médio de 133,72 mg/dL foi constante, e para o corante 134,26 mg/dL (Gráfico 4).



Rutina, machos: $\bar{Y} = 133,72$ mg/dL

Rutina, fêmeas: $\hat{Y} = 146,6480 - 0,7916 **Ru$ $r^2 = 0,89$

Monascus, machos: $\bar{Y} = 134,25$ mg/dL

Monascus, fêmeas: $\hat{Y} = 112,6230 - 0,8282 * Mo + 0,01172 * Mo^2$ $R^2 = 0,89$

Gráfico 4 – Estimativa do triacilglicerol de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

A maior dose de rutina (60 mg) em fêmeas fez com que os níveis sanguíneos de triacilgliceróis nesses animais atingissem uma concentração mínima de 99,15 mg/dL. Esta atividade da substância torna-se bem visível quando se nota que o grupo-controle apresenta valores médios de triglicerídeos de 146,65 mg/dL.

Monascus em sua maior dose aplicada em fêmeas (100 mg), atuou de forma antagônica ao flavonóide e elevou o triacilglicerol em 147,00 mg/dL. Estima-se que 35,33 mg do corante reduz de forma significativa tais níveis para 97,99 mg/dL.

Importante ressaltar que as doses de monascus acima de 40 mg elevaram gradativamente os níveis de colesterol e triacilglicerós nas fêmeas.

- Albumina

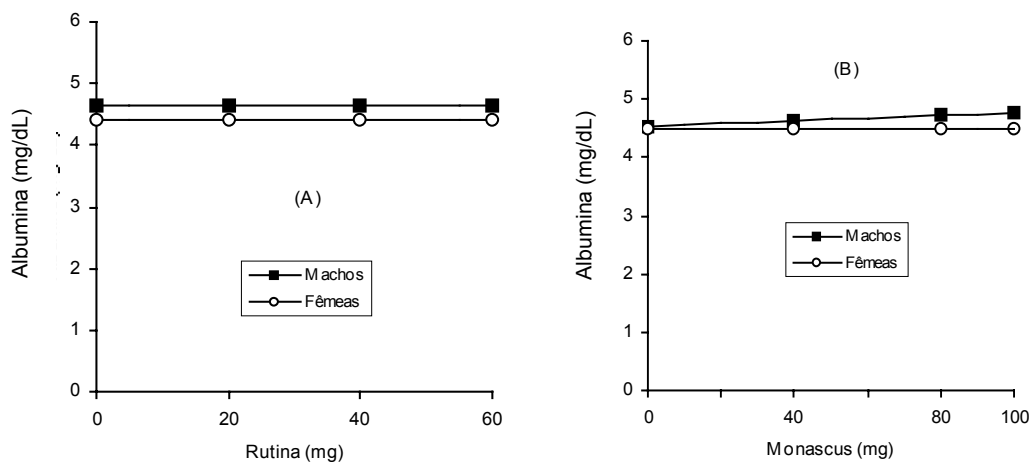
A Tabela 2 mostra que machos e fêmeas, em todos os grupos e tempos considerados, apresentaram alterações estatisticamente significativas de

Tabela 2 – Albumina, creatinina, uréia e ácido úrico de machos e fêmeas de coelho tratados com diferentes doses de rutina e de monascus

Grupos	Tempo (Dias)	Albumina (mg/dL)		Creatinina (mg/dL)		Uréia (mg/dL)		Ácido úrico (mg/dL)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Ração	0	4,65 Aa	4,33 Ba	1,18 Ab	1,24 Aa	27,52 Aa	28,54 Ab	0,14 Aa	0,14 Aa
	28	4,73 Aa	4,50 Aa	1,53 Aa	1,30 Ba	27,96 Ba	36,58 Aa	0,13 Aa	0,15 Aa
Ração + 20 mg de rutina	0	4,61 Aa	4,68 Aa	1,23 Aa	1,18 Aa	28,20 Aa	28,60 Aa	0,15 Aa	0,15 Aa
	28	4,67 Aa	4,47 Aa	1,28 Aa	1,37 Aa	29,10 Aa	29,04 Aa	0,12 Aa	0,11 Aa
Ração + 40 mg de rutina	0	4,60 Aa	4,56 Aa	1,20 Aa	1,29 Aa	28,62 Aa	29,48 Aa	0,14 Aa	0,14 Aa
	28	4,52 Aa	4,33 Aa	1,14 Ba	1,37 Aa	26,32 Ba	33,86 Aa	0,15 Aa	0,13 Aa
Ração + 60 mg de rutina	0	4,49 Aa	4,50 Aa	1,17 Aa	1,31 Aa	30,12 Aa	28,40 Aa	0,14 Aa	0,14 Aa
	28	4,68 Aa	4,33 Ba	1,29 Aa	1,30 Aa	30,04 Aa	29,30 Aa	0,13 Aa	0,14 Aa
Ração + 40 mg de monascus	0	4,42 Aa	4,31 Aa	1,13 Aa	1,20 Ab	28,38 Aa	29,46 Aa	0,15 Aa	0,13 Aa
	28	4,52 Aa	4,43 Aa	1,29 Aa	1,47 Aa	29,84 Aa	29,56 Aa	0,13 Aa	0,12 Aa
Ração + 80 mg de monascus	0	4,50 Ab	4,53 Aa	1,08 Aa	1,22 Aa	29,90 Aa	31,18 Aa	0,10 Ab	0,13 Aa
	28	4,81 Aa	4,62 Aa	1,29 Aa	1,39 Aa	29,78 Aa	31,28 Aa	0,22 Aa	0,11 Ba
Ração + 100 mg de monascus	0	4,43 Aa	4,52 Aa	1,07 Ab	1,03 Aa	28,28 Aa	29,76 Aa	0,12 Aa	0,15 Aa
	28	4,58 Aa	4,37 Aa	1,31 Aa	1,23 Aa	31,07 Aa	30,04 Aa	0,16 Aa	0,11 Aa

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

Em cada característica, cada grupo e cada sexo (coluna), a difere de b pelo teste F (P < 0,05).



Rutina, machos: $\bar{Y} = 4,65$ mg/dL

Rutina, fêmeas: $\bar{Y} = 4,41$ mg/dL

Monascus, machos: $\hat{Y} = 4,5400 + 0,002204 * Mo$ $r^2 = 0,56$

Monascus, fêmeas: $\bar{Y} = 4,48$ mg/dL

Gráfico 5 – Estimativa da albumina de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

albumina no grupo-controle, no início do ensaio, e no grupo ração + 60 mg de rutina ao final dos tratamentos.

Machos tratados com 80 mg do corante monascus apresentaram variações estatisticamente significativas quando consideramos os tempos inicial e final do ensaio biológico, a tabela indica um aumento do constituinte de 4,50 mg/dL para 4,81 mg/dL.

Proteínas séricas em coelhos adultos são similares aos de outras espécies. Quantidades relativas de albumina compreendem 40-60% das proteínas (BORTOLLOTTI et al., 1989).

O fígado é o principal órgão de produção da albumina, que é uma molécula transportadora no sangue de medicamentos, nutrientes, e outros constituintes químicos. A hiperalbuminemia ocorre na desidratação. A redução dos níveis, entretanto, é observada em várias situações, como na síndrome nefrótica pela perda maciça do constituinte pelos rins e a diminuição da capacidade de síntese pelo organismo (LIMA, 1985).

Em humanos os valores normais de albumina no plasma são na ordem de 3,5 a 5 mg/dL. Verificam-se valores nesta faixa nos animais empregados no grupo-controle (4,65 mg/dL em machos e 4,33 mg/dL em fêmeas, no tempo zero do experimento), assim como nas análises sorológica dos demais animais dos grupos formados de acordo com o tratamento empregado no ensaio.

Correlacionando-se os resultados obtidos com o fato de que a diminuição de albumina está associada com doenças renais e hepáticas, conclui-se que a rutina e o monascus não interferiram sobre os órgãos responsáveis pelo metabolismo do constituinte.

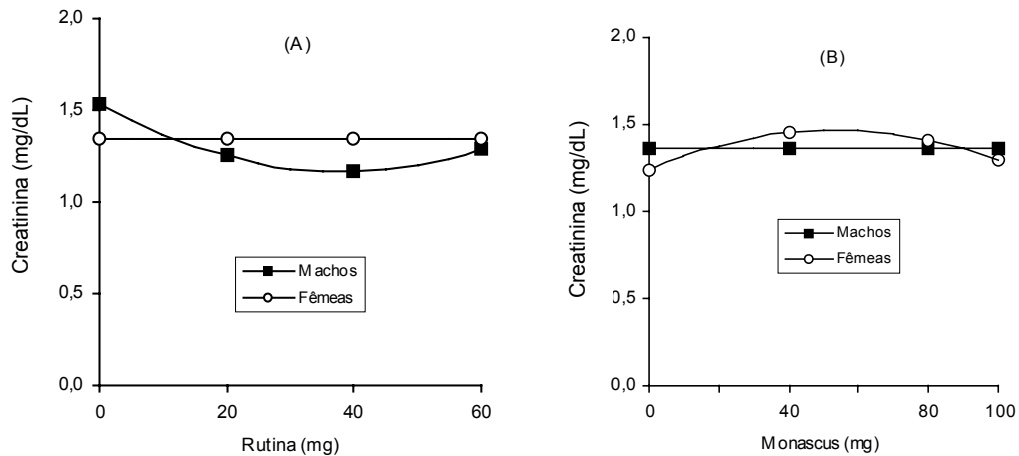
A albumina manteve os mesmos níveis no soro sanguíneo em machos e fêmeas tratados com rutina em todas as doses. Machos permaneceram com 4,65 mg/dL de albumina e fêmeas com 4,41 mg/dL (Gráfico 5).

Monascus não atuou significativamente no aumento do constituinte em machos a medida que o tratamento com 100 mg elevou para 4,76 mg/dL de albumina, quando considerado o valor médio de 4,54 mg/dL no grupo sem tratamento (grupo-controle). O valor médio de 4,48 mg/dL de albumina foi constante para as fêmeas em todos os grupos do ensaio biológico (Gráfico 5).

- *Creatinina*

Machos e fêmeas apresentaram diferenças significativas nos grupos-controle e ração + rutina 40 mg aos 28 dias. Entre animais do mesmo sexo e grupo, nos tempos 0 e 28 dias, variações estatisticamente significativas foram encontradas nos machos que receberam ração e ração + 100 mg de monascus. Fêmeas apresentaram variações nos grupos que consumiram ração + 40 mg de monascus, em todos os grupos citados os níveis de creatinina aumentaram ao final dos 28 dias de tratamento (Tabela 2).

Considerando-se os valores normais de creatinina para machos de 1,18 mg/dL e para fêmeas de 1,24 mg/dL, as variações com os diversos tratamentos foram relativamente baixas para alterações fisiológicas nos animais. Em humanos os valores normais de creatinina oscilam entre 1 a 2 mg/dL, sendo o elemento nitrogenado do sangue menos variável, uma vez que pequenos danos a nível renal não são capazes de promover alterações séricas do constituinte (RAGAN, 1989).



$$\text{Rutina, machos: } \hat{Y} = 1,5386 - 0,01952 * Ru + 0,0002550 ** Ru^2 \quad R^2 = 0,89$$

$$\text{Rutina, fêmeas: } \bar{Y} = 1,34 \text{ mg/dL}$$

$$\text{Monascus, machos: } \bar{Y} = 1,36 \text{ mg/dL}$$

$$\text{Monascus, fêmeas: } \hat{Y} = 1,2384 + 0,008684 Mo - 0,00008145 * Mo^2 \quad R^2 = 0,97$$

Gráfico 6 – Estimativa da creatinina de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

A creatinina se forma do ácido fosfórico da fosfocreatina muscular, sendo formada a partir de reações dos aminoácidos arginina e glicina, sendo, portanto, um produto endógeno do catabolismo da creatina a nível muscular. É eliminada pelos rins em quantidade singularmente constantes, através da filtração glomerular em excreção tubular ativa. Seus valores independem da ingestão de proteínas da alimentação e não é afetada pelo volume urinário (LIMA, 1985).

Elevações dos níveis séricos de creatinina no sangue ocorre por insuficiência renal, quando a taxa de uréia se encontra aumentada. Na nefrite incipiente registram-se valores entre 2 e 4 mg/dL em humanos, na glomerulonefrite crônica com uremia as taxas se elevam até 35 mg/dL o que se prognostica desfecho letal próximo. Valores acima de 5 mg/dL evidenciam pronunciada insuficiência renal. Obstruções urinárias, por afecções da próstata, bexiga ou ureter, bem como na oligúria reflexa provocada pela nefrolitíase, verificam-se índices muito elevados de creatinina, sendo que este quadro é reversível pela remoção da causa da obstrução (LIMA, 1985).

Os resultados obtidos indicam que rutina e monascus, nas doses empregadas ao longo do tratamento, não promoveram efeitos toxicológicos em coelhos machos e fêmeas quando mensurado os níveis de creatinina como parâmetro.

Tratamentos com o corante em machos e do flavonóide em fêmeas não atuarem em modificações dos níveis séricos de creatinina. Os grupos de machos e fêmeas para as tratamentos citados permaneceram com valores médios de 1,36 mg/dL e 1,34 mg/dL respectivamente (Gráfico 6).

Monascus em doses de 53,31 mg acarretariam num aumento para 1,47 mg/dL de creatinina e o grupo-controle apresentou valores médios de 1,24 mg/dL. O grupo-controle de machos submetidos a rutina apresentaram a maior média (1,54 mg/dL). Estima-se que a menor média calculada de 1,17 mg/dL se apresentaria em um tratamento com 38,27 mg do corante.

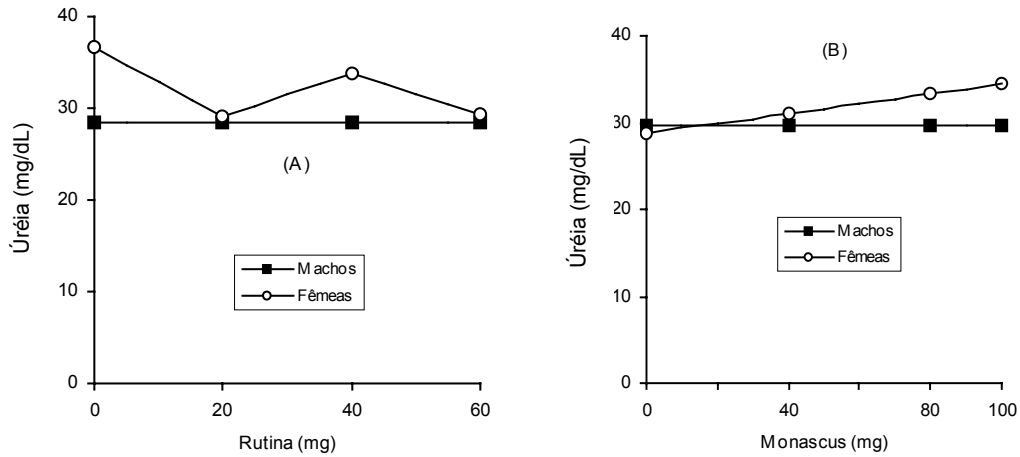
- Uréia

Apenas fêmeas tratadas com ração apresentaram variações estatisticamente significativas, quando comparamos os tempos inicial e final do experimento (Tabela 2).

Relacionando-se os grupos de sexos diferentes, variações estatisticamente significativas são mostradas no quadro no grupo-controle aos 28 dias, assim como nos grupos de machos e fêmeas tratadas com 40 mg de rutina, machos apresentaram níveis séricos de uréia inferiores aos das fêmeas.

Observa-se que os valores normais de uréia nos coelhos foram de 27,52 mg/dL para machos e 28,54 mg/dL em fêmeas. Em humanos os valores variam de 20 a 40 mg/dL em indivíduos normais (Tabela 2).

Coelhos eliminam amônia como principal forma de excreção nitrogenada. Entretanto, nos mamíferos em geral, a uréia é o principal produto final do metabolismo das proteínas, sendo responsável pela excreção de 80% do nitrogênio não protéico excretado pela urina (LIMA, 1985). A dosagem sérica de uréia é comumente utilizada para se avaliar as funções renais.



Rutina, machos: $\bar{Y} = 28,36$ mg/dL

Rutina, fêmeas: médias observadas

Monascus, machos: $\bar{Y} = 29,66$ mg/dL

Monascus, fêmeas: $\hat{Y} = 28,7654 + 0,05636 * Mo$ $r^2 = 0,60$

Gráfico 7 – Estimativa da uréia de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

A produção da uréia ocorre no fígado a partir de aminoácidos e do íon NH_4^+ , derivado da ação bacteriana no intestino grosso. O grupo NH_2 dos aminoácidos que não é empregado pelo organismo é transformado em uréia.

O aumento no teor de uréia no sangue pode ser devido a redução da eliminação renal, aumento do catabolismo de proteínas ou combinação desses dois processos (LIMA, 1985). Causas patológicas também são inseridas como responsáveis pelo aumento de uréia no sangue.

Valores elevados de uréia ocorrem a partir de choques traumáticos, choques hemorrágicos, desidratação aguda ou perda de eletrólitos, descompensação cardíaca, infecção aguda e toxemia, catabolismo protéico aumentado (LIMA, 1985).

LIMA (1985), também cita que a elevação da taxa de uréia por causa renal é constatada na glomerulonefrite, em que níveis podem atingir 300 mg/dL, assim como na nefrosclerose; na tuberculose renal; no rim policístico; nas nefropatias malignas; no envenenamento pelo chumbo; na necrose tubular aguda; e na hipogenesia renal.

Redução de uréia sangüínea são causadas por esteróides anabólicos, diminuição da ingestão protéica na dieta e na insuficiência hepática aguda.

MITRUKA e RAW (1981), citam que as variações normais de uréia em coelhos se encontram numa faixa semelhante àquelas encontradas em um homem. Desta forma, de acordo com os resultados apresentados os compostos testados não apresentaram efeito toxicológico nas doses administradas.

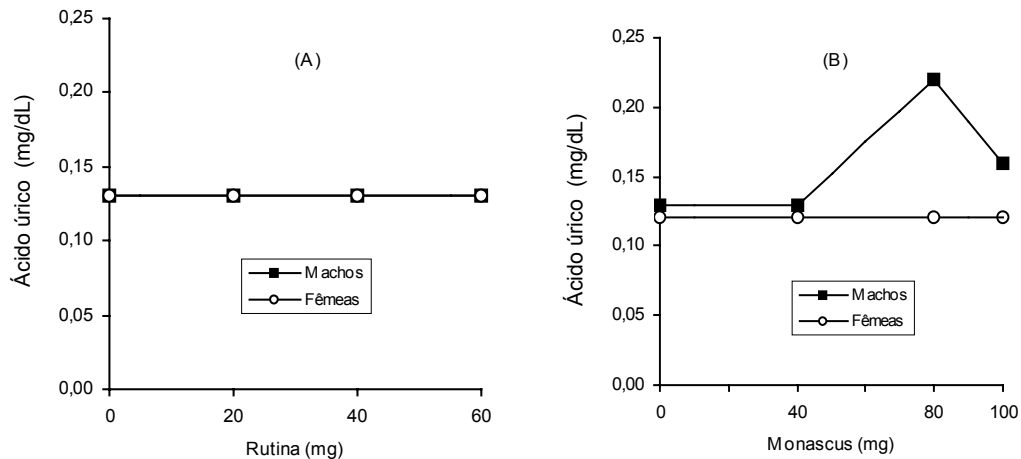
Rutina em todos os grupos de machos tratados não interferiu nos níveis de uréia, mantendo-se constante o valor de 28,36 mg/dL. O grupo-controle das fêmeas demonstraram a maior média de uréia no soro com 36,58 mg/dL do constituinte. A menor estimativa foi encontrada com o tratamento de 20 mg, onde o nível sérico da uréia atingiu um valor médio de 29,04 mg/dL (Gráfico 7).

Monascus em coelhos machos também não influenciaram em variações dos valores médios de uréia em tais animais, mantendo-se constante em 29,66 mg/dL. A dose diária de 100 mg do corante em fêmeas elevaram o nível da uréia para um valor médio de 34,40 mg/dL, em comparação com o grupo-controle que apresentou a menor média de 28,77 mg/dL (Gráfico 7).

- *Ácido úrico*

Ácido úrico apresentou variações estatisticamente significativas, quando comparamos machos e fêmeas em todos os grupos e tempos, nos tratamentos com ração + 80 mg de monascus aos 28 dias. Considerando-se mesmo sexo e grupo, apenas ocorreram alterações estatisticamente significativas em machos do mesmo grupo de tratamento com 80 mg do corante. A Tabela 2 mostra o aumento do constituinte neste grupo de 0,10 mg/dL para 0,22 mg/dL após o último dia de tratamento.

O ácido úrico é o principal metabólito das purinas no organismo humano. Elevação nos níveis do constiuinte pode ocorrer em todas as formas de insuficiência renal e podem muitas vezes preceder o aumento da uréia sangüínea, alcançando níveis de até 15 mg/dL. Pode ocorrer ainda na



Rutina, machos: $\bar{Y} = 0,13$ mg/dL
 Rutina, fêmeas: $\bar{Y} = 0,13$ mg/dL
 Monascus, machos: médias observadas
 Monascus, fêmeas: $\bar{Y} = 0,12$ mg/dL

Gráfico 8 – Estimativa do ácido úrico de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

obstrução do trato renal, lesões renais, hipogenesia dos rins, insuficiência cardíaca congênita, no hipotireoidismo, na hipertensão, na quimioterapia de tumores malignos, na psoríase, no jejum prolongado e no hiperparatireoidismo (LIMA, 1985).

Os valores normais de ácido úrico em coelhos machos foi da ordem de 0,14 mg/dL e em fêmeas de 0,14 mg/dL, no início do tratamento no grupo-controle. A taxa normal de ácido úrico no soro ou plasma de humanos varia de 2 a 6,5 mg/dL. Pela variação que existe no corpo humano e considerando a baixa variação encontrada nos coelhos em todos os grupos do ensaio, pode-se concluir que os compostos não interferiram toxicologicamente no metabolismo deste constituinte bioquímico ou de qualquer órgão relacionado com os valores normais encontrados. MITRUKA e RAW (1981), confirmam que coelhos apresentam valores inferiores de ácido úrico quando comparados com a espécie humana.

Após 28 dias de tratamento com rutina todos os grupos em estudo (machos e fêmeas), mantiveram constantes as médias de ácido úrico no soro sangüíneo dos animais (0,13 mg/dL).

Fêmeas expostas as diferentes doses de monascus também não alteraram o referido constituinte, quando em comparação com o grupo-controle, permanecendo com médias de 12 mg/dL. Variações neste parâmetro só foi verificado em machos, nos quais a menor média estimada (0,13 mg/dL) foi calculada no tratamento situado entre o grupo-controle até 40 mg e a maior (0,22 mg/dL) foi encontrada no tratamento com a dose de 80 mg do corante corante. Ressalva-se que ocorreu uma redução progressiva dos níveis séricos de ácido úrico em machos, quando analisamos o intervalo entre as doses diárias de monascus de 80 a 100 mg (Gráfico 8).

- *Glicose*

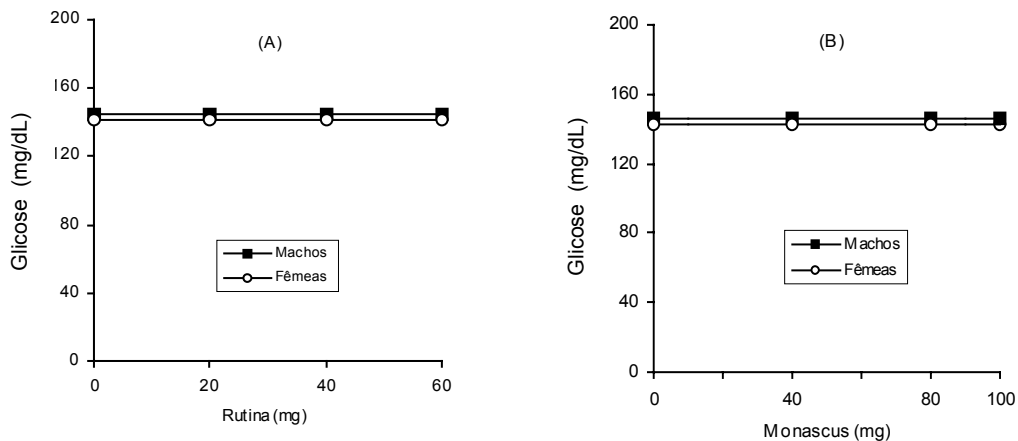
Alterações que ocorreram nos níveis séricos de glicose não foram estatisticamente significativos em todos os grupos e tempos do ensaio biológico (Tabela 3).

Metabolismo de carboidratos é freqüentemente mensurado através da determinação da glicose sérica. Dentre os fatores que afetam os níveis normais de glicose em coelhos estão os distúrbios hereditários (KOZMA et al., 1974), idade, hipotermia, medicamentos e dieta (PÉGORIER et al., 1987). Evidentemente que tais fatores podem ser incluídos para a espécie humana. Portanto, os resultados indicam uma ausência de toxicidade de rutina e monascus sobre o metabolismo de carboidratos nos coelhos nas doses empregadas.

Considerando-se que a dieta de coelhos é constituída de 80% de carboidratos e seu metabolismo é intenso para esta classe de compostos orgânicos, o resultado apresentado na Tabela 3 é relevante quanto ao baixo potencial toxicológico do monascus e da rutina nas doses empregadas.

Os valores normais de glicose no início do experimento no grupo-controle foi de 139,14 mg/dL para machos e de 137,62 mg/dL em fêmeas. No corpo humano a glicose sérica, em níveis normais, varia entre 90 a 120 mg/dL.

A glicose é o único carboidrato circulante no sangue, outros monossacarídeos podem transitoriamente ser encontrados no sangue, após a alimentação, mas são prontamente convertidas à glicose no fígado.



Rutina, machos: $\bar{Y} = 144,73$ mg/dL

Rutina, fêmeas: $\bar{Y} = 141,65$ mg/dL

Monascus, machos: $\bar{Y} = 145,86$ mg/dL

Monascus, fêmeas: $\bar{Y} = 142,55$ mg/dL

Gráfico 9 – Estimativa da glicose de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

A glicemia se eleva depois da ingestão de alimentos, seu nível atinge cerca de 160 mg/dL, dentro de um intervalo médio de uma hora em uma pessoa normal. Transposto este nível (limiar renal) a glicose é excretada na urina, indicando uma condição patológica (LIMA, 1985).

O controle glicêmico ocorre pela interação de diversos hormônios, destacando-se a insulina produzida pelas células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas (atuando na redução da taxa glicêmica). O glucagon produzido pelas células alfa das mesmas ilhotas, a epinefrina, a norepinefrina, os glicocorticóides, o ACTH e o hormônio do crescimento atuam na elevação da glicemia. Patologicamente, altos níveis de glicose são encontrados nos casos de diabetes mellitus.

Os níveis de glicose não sofreram alterações pelo tratamento com as substâncias-teste. Machos tratados com rutina e monascus em suas diferentes doses mantiveram o mesmo valor de glicose que o grupo-controle: respectivamente 144,73 mg/dL e 145,86 mg/dL para o flavonóide e para o corante natural (Gráfico 9).

Tabela 3 – Glicose, gama-GT, bilirrubina direta e total de machos e fêmeas de coelho tratados com diferentes doses de rutina e de monascus

Grupos	Tempo (Dias)	Glicose (mg/dL)		Gama-GT (UI)		Bilirrubina direta (mg/dL)		Bilirrubina total (mg/dL)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Ração	0	139,14 Aa	137,62 Aa	13,60 Aa	12,80 Aa	0,03 Aa	0,03 Aa	0,24 Aa	0,26 Aa
	28	147,78 Aa	140,62 Aa	12,00 Aa	13,40 Aa	0,04 Aa	0,05 Aa	0,26 Aa	0,31 Aa
Ração + 20 mg de rutina	0	141,44 Aa	139,60 Aa	10,80 Aa	10,20 Aa	0,04 Aa	0,03 Ab	0,25 Aa	0,23 Aa
	28	143,58 Aa	142,58 Aa	11,00 Aa	10,00 Aa	0,04 Aa	0,07 Aa	0,30 Aa	0,22 Aa
Ração + 40 mg de rutina	0	143,08 Aa	145,58 Aa	8,60 Aa	7,80 Aa	0,03 Aa	0,04 Aa	0,20 Aa	0,22 Aa
	28	143,46 Aa	144,52 Aa	7,60 Aa	8,40 Aa	0,04 Aa	0,04 Aa	0,23 Aa	0,24 Aa
Ração + 60 mg de rutina	0	140,86 Aa	136,74 Aa	8,80 Aa	9,80 Aa	0,05 Aa	0,04 Aa	0,23 Aa	0,25 Aa
	28	144,08 Aa	138,86 Aa	9,60 Aa	8,80 Aa	0,04 Aa	0,04 Aa	0,28 Aa	0,28 Aa
Ração + 40 mg de monascus	0	140,32 Aa	136,72 Aa	8,20 Aa	8,60 Aa	0,04 Aa	0,04 Aa	0,22 Aa	0,19 Aa
	28	139,15 Aa	136,20 Aa	8,40 Aa	10,20 Aa	0,05 Aa	0,06 Aa	0,27 Aa	0,26 Aa
Ração + 80 mg de monascus	0	145,32 Aa	143,10 Aa	8,60 Aa	8,80 Aa	0,04 Aa	0,04 Aa	0,21 Aa	0,24 Ab
	28	149,00 Aa	144,32 Aa	9,00 Aa	8,40 Aa	0,06 Aa	0,05 Aa	0,30 Aa	0,38 Aa
Ração + 100 mg de monascus	0	145,76 Aa	146,82 Aa	9,20 Aa	8,20 Aa	0,04 Aa	0,04 Aa	0,24 Ab	0,20 Ab
	28	147,50 Aa	149,04 Aa	8,00 Aa	7,60 Aa	0,05 Aa	0,05 Aa	0,38 Aa	0,35 Aa

Em cada característica, cada grupo e cada tempo (linha), A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada característica, cada grupo e cada sexo (coluna), a difere de b pelo teste F ($P < 0,05$).

Fêmeas tratadas com rutina mantiveram a média de 141,65 mg/dL de glicose enquanto o tratamento com monascus em todos os grupos manteve a média encontrada no grupo-controle, ou seja, 142,55 mg/dL (Gráfico 9).

- *Bilirrubina direta*

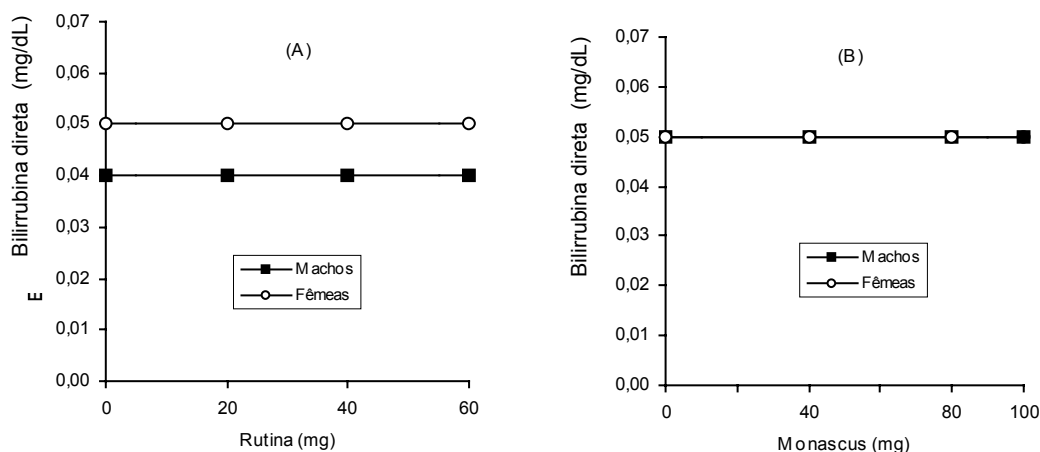
Apenas o grupo de fêmeas tratadas com ração e 20 mg de rutina apresentaram alterações estatisticamente significativas, ocorrendo um aumento de 0,03 mg/dL do constituinte para 0,07 mg/dL ao final do tratamento (Tabela 3).

Os valores normais das dosagens sorológicas de bilirrubina direta em coelhos machos e fêmeas foi de 0,03 mg/dL. Em humanos os valores normais desse constituinte varia de 0,1 a 0,4 mg/dL. A origem da bilirrubina ocorre a partir da destruição fisiológica de hemácias envelhecidas localizadas no sistema reticuloendotelial, à custa da hemoglobina. Bilirrubina é transportada ao fígado onde é conjugada pela glicuronil transferase e secretada na bile. MUÑOZ et al. (1974), sugere que a glicose exógena modifica o processo de conjugação hepática da bilirrubina.

Aumento dos níveis sérico de bilirrubina ocorre na icterícia obstrutiva e hepatocelular; hepatite virótica, cirrose e necrose hepática; tumores hepáticos; intoxicações por éter, clorofórmio e tetracloreto de carbono; anemia hemolítica, malária e envenenamento por cogumelos ou mordidas de ofídeos (LIMA, 1985).

Bilirrubina apresentou os mesmos valores médios para animais machos e fêmeas, em todos os grupos formados para o estudo da atividade toxicológica do monascus (0,05 mg/dL). Desta forma, concluiu-se que o composto não atuou sobre os valores normais de bilirrubina das cobaias (Gráfico 10).

A mesma observação encontrada no parágrafo acima ocorreu para o tratamento com a rutina. Todavia, em machos todos os valores médios encontrados foram de 0,04 mg/dL e nas fêmeas de 0,05 mg/dL (Gráfico 10).



Rutina, machos: $\bar{Y} = 0,05$ mg/dL

Rutina, fêmeas: $\bar{Y} = 0,05$ mg/dL

Monascus, machos: $\bar{Y} = 0,04$ mg/dL

Monascus, fêmeas: $\bar{Y} = 0,05$ mg/dL

Gráfico 10 – Estimativa da bilirrubina direta de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

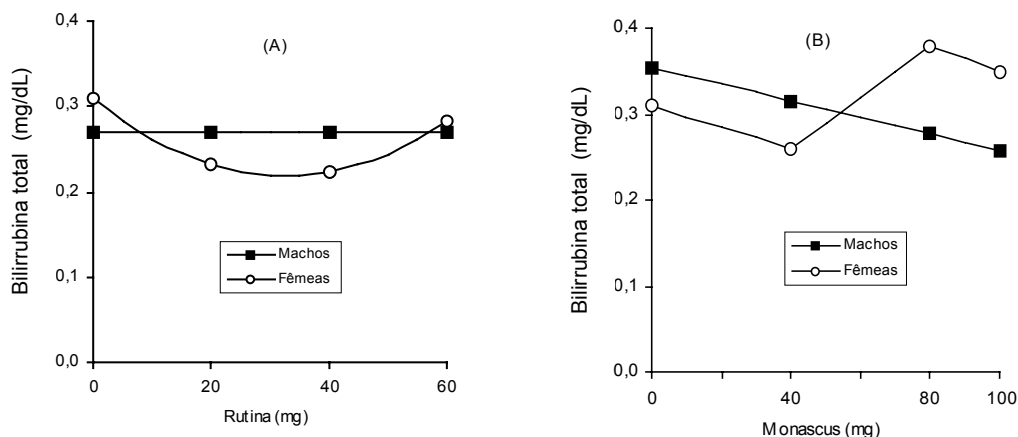
- Bilirrubina total

Fêmeas tratadas com monascus nos grupos ração + 80 mg e ração + 100 mg do corante apresentaram diferenças estatisticamente significativas, quando comparado os tempos inicial e final do ensaio biológico (Tabela 3).

Os resultados apresentados para bilirrubina total e direta não representam efeito toxicológico das substâncias testadas. As diferenças estatisticamente significativas encontradas não significam, a nível fisiológico, que o flavonóide ou o corante tenham causado patologias hepáticas. Inclusive os resultados obtidos de outros constituintes comprovam tal afirmação.

Observando-se o respectivo gráfico acima, certifica-se que as estimativas de valores médios para as dosagens de bilirrubina total em machos, após 28 dias de tratamento com rutina, permaneceram constantes em relação ao grupo-controle (0,27 mg/dL). Concomitantemente, nota-se que o grupo-controle das fêmeas atingiu o valor médio mais alto de bilirrubina total (0,31 mg/dL), e uma dose de 32,61 mg provavelmente acarretaria na diminuição deste valor médio para 0,22 mg/dL.

O Gráfico 11, referente ao tratamento realizado com monascus, mostra diferenças entre os níveis do constituinte em machos e fêmeas. A análise gráfica indica que a bilirrubina diminuiu no soro da menor para a maior dose em animais machos: 0,35 mg/dL no grupo-controle e 0,26 mg/dL no tratamento diário com 100 mg do corante.



Rutina, machos: $\bar{Y} = 0,27$ mg/dL

Rutina, fêmeas: $\hat{Y} = 0,3095 - 0,005625Ru + 0,00008625 * Ru^2$ $R^2 = 0,93$

Monascus, machos: $\hat{Y} = 0,3545 - 0,0009644 * Mo$ $r^2 = 0,65$

Monascus, fêmeas: médias observadas

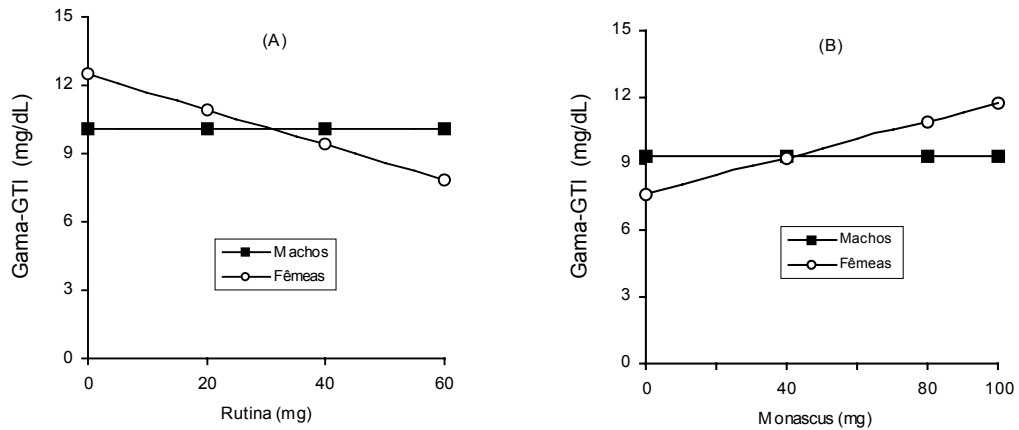
Gráfico 11 – Estimativa da bilirrubina total de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

Fêmeas do grupo que ingeriam diariamente 80 mg de monascus demonstraram a maior estimativa média de nível sérico do constituinte (0,38 mg/dL), e o grupo que ingeria 40 mg diminui seus níveis para 0,27 mg/dL.

- Gama glutamil transferase (Gama-GT)

Não ocorreram alterações estatisticamente significativas ($P > 0,05$) em todos os grupos e tempos do ensaio biológico (Tabela 3).

A gama glutamil transferase (E.C. 2.3.2.2) está relacionada com a membrana plasmática e catalisa a conjugação de aminoácidos com a gama cisteinil glicina, produzindo gama-glutamil aminoácido e cisteinil glicina que resulta na transferência do resíduo de glutamil do glutation para o



Rutina, machos: $\bar{Y} = 10,05$

Rutina, fêmeas: $\hat{Y} = 12,4600 - 0,07700 * Ru \quad r^2 = 0,77$

Monascus, machos: $\bar{Y} = 9,35$

Monascus, fêmeas: $\hat{Y} = 7,6441 + 0,04102 * Mo \quad r^2 = 0,50$

Gráfico 12 – Estimativa do gama-GT de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

aminoácido que está penetrando no citoplasma celular. Esta reação é um exemplo de translocação de grupo no qual o substrato transportado aparece em uma forma química diferente dentro da célula. Todo este processo representa uma forma de entrada de aminoácidos para o interior celular (LEHNINGER, 1995).

Pode-se estimar que uma alteração acentuada dos níveis normais da gama glutamil transferase poderia afetar a entrada de aminoácidos a nível celular. Desta forma, poderia haver alterações da síntese protéica a nível de retículo endoplasmático rugoso e, ou, poliribossomos. Entretanto, conforme os dados obtidos indicam, as dosagens utilizadas nos tratamentos de rutina e monascus não apresentarem toxicidade bioquímica sobre este parâmetro analisado.

Concentrações de Gama-GT em machos após 28 dias tratados com rutina nas diferentes doses demonstradas na metodologia permaneceram constantes, quando comparadas com o grupo que não sofreu exposição ao produto. Desta forma, o valor médio encontrado para todos os animais foi de 10,05 UI.

A maior estimativa da média de Gama-GT em fêmeas submetidas ao tratamento com o flavonóide estudado foi de 12,46 UI no grupo-controle e a menor estimativa foi verificada com a dosagem diária de 60 mg, apresentando níveis sanguíneos de 7,84 UI (Gráfico 12).

Machos quando tratados com monascus permaneceram com seu nível médio de Gama-GT em 9,35 UI em todos os grupos. Entretanto, quando consideramos o estudo sobre as fêmeas, verifica-se que a dose de 100 mg do corante natural aumentou a média dos níveis do constituinte (11,75 UI), sendo que o grupo-controle demonstrou a menor média (7,64 UI). Importante ressaltar que ao observarmos o Gráfico 12, verifica-se que rutina e monascus agiram de forma antagônica sobre os níveis séricos de Gama-GT sobre as fêmeas.

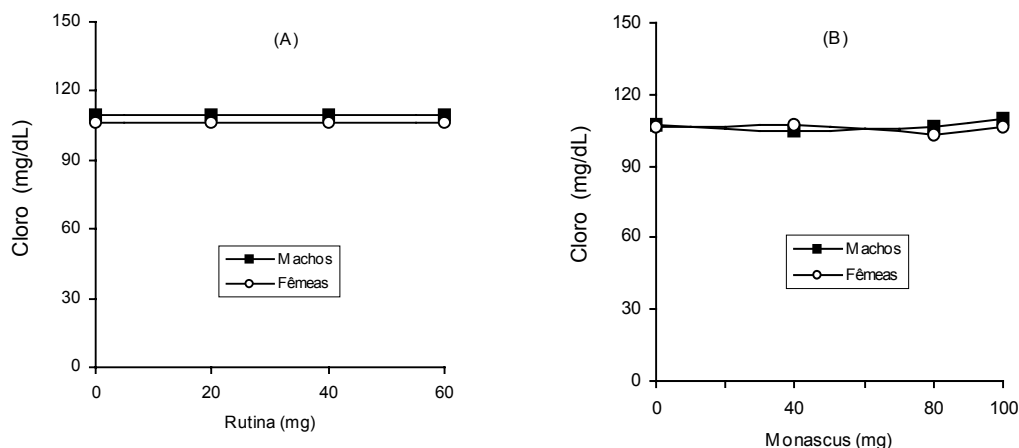
- *Cloro*

Os valores normais de cloro para coelhos machos e fêmeas foram de 103,60 mg/dL e 103,58 mg/dL, respectivamente. Em humanos os valores normais são da ordem de 570 a 620 mg/dL no plasma.

A diminuição de cloro do sangue pode ser detectada na diabetes grave com acidose, nos estados febris, nos distúrbios gastrointestinais, na sudorese abundante, na insuficiência renal e pancreatites agudas (LIMA, 1985). Segundo o mesmo autor, a hiperclorêmia, apesar de ser mais rara, pode ocorrer nos estados de nefrose, hipertensão, pela administração excessiva de solução fisiológica nos pós-operatório e na anemia.

Machos e fêmeas apresentaram diferenças estatisticamente significativas, para os níveis sanguíneos de cloro, quando ingeriram 20 mg do flavonóide e 80 mg do corante diariamente ao longo dos 28 dias de tratamento (Tabela 4).

Entre os mesmos grupos, machos tratados apenas com ração e todos tratados com rutina, apresentam diferenças estatisticamente significativas nos níveis sanguíneos de cloro. Fêmeas que consumiram ração + 60 mg de flavonóide também apresentaram diferenças estatisticamente significativas ao final do experimento.



Rutina, machos: $\bar{Y} = 109,64$ mg/dL

Rutina, fêmeas: $\bar{Y} = 106,21$ mg/dL

Monascus, machos: $\hat{Y} = 107,3480 - 0,1184Mo + 0,001395 * Mo^2$ $R^2 = 0,79$

Monascus, fêmeas: médias observadas

Gráfico 13 – Estimativa do cloro de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

Devido ao fato do grupo-controle de machos apresentar diferenças estatisticamente significativas, não se pode confirmar que a rutina tenha atuado no aumento dos níveis séricos de cloro nas cobaias. Pode-se imaginar que pela grande amplitude de variação do nível normal encontrado em humanos, mesmo sendo estatisticamente significativo, os resultados em coelhos não podem ser considerados como sendo tóxicos a nível fisiológico.

Rutina não alterou os valores de cloro em machos e fêmeas dos grupos constituídos a partir das doses diárias aplicadas, quando comparados com o grupo-controle. Machos permaneceram com 109,64 mg/dL e fêmeas com 106,21 mg/dL ao final do tratamento (Gráfico 13).

O corante natural monascus alterou os níveis sanguíneos de cloro nos animais. A maior média estimativa em machos foi produzida em animais cujo tratamento foi de 100 mg por dia (109,45 mg/dL), sendo que o menor valor médio encontrado seria de 104,83 mg/dL, correlacionado o mesmo com uma dose calculada diária de 42,47 mg de monascus ao longo de 28 dias.

Fêmeas tratadas com o corante natural em doses de 80 mg, além do grupo-controle, apresentaram valores médios de cloro de 106,12 mg/dL, este se constitui na menor estimativa encontrada. O valor máximo do constituinte foi de 107,24 mg/dL, obtido em animais submetidos a doses de 40 mg diária do composto estudado.

Conclui-se que as variações nos níveis de cloro encontradas nos animais submetidos ao tratamento de monascus podem ser consideradas irrelevantes, uma vez que os valores médios obtidos dos níveis sorológicos de cloropouco se diferenciam dos grupos-controle.

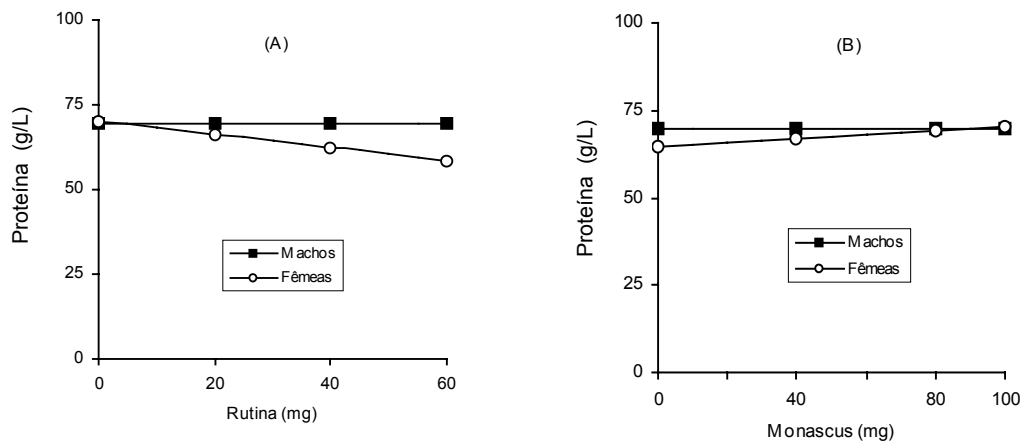
- Proteínas

Machos e fêmeas tratadas com 20 mg de rutina, no tempo zero, apresentavam diferenças estatisticamente significativas. Após os 28 dias de tratamento essa diferença não se apresentava de forma significativa. Entretanto, os animais submetidos ao consumo diário de 40 ou 60 mg do flavonóide apresentaram variações significativas no tempo final do ensaio.

Avaliando-se a Tabela 4, verifica-se que a mesma mostra que dentro dos mesmos grupos constituídos, apenas fêmeas tratadas com ração e 60 mg de rutina apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Todos os animais apresentaram elevação de proteínas totais em seus níveis séricos com o tratamento realizado com as substâncias.

Segundo BORTOLOTTI et al. (1989) os níveis normais de proteínas totais em coelhos adultos varia entre 60 e 70 g/L. Considerando-se que nas amostras realizada no tempo final (28 dias), os animais estavam com aproximadamente 85 dias, a média apresentada em todos os grupos tratados se encontravam em níveis normais. Conseqüentemente, se estima que não houve efeitos toxicológicos das substâncias-teste nas doses assimiladas pelos animais.

Conforme citadas anteriormente, reduções dos níveis de albumina e proteína totais podem se associar com lesões hepáticas e renais. Proteínas totais podem apresentar valores acima do normal em desidratações e hipotermia.



Rutina, machos: $\bar{Y} = 69,25 \text{ g/L}$

Rutina, fêmeas: $\hat{Y} = 70,2760 - 0,1967 * Ru \quad r^2 = 0,95$

Monascus, machos: $\bar{Y} = 69,45 \text{ g/L}$

Monascus, fêmeas: $\hat{Y} = 64,8295 + 0,05737 * Mo \quad r^2 = 0,89$

Gráfico 14 – Estimativa da proteína de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

Todas as doses de rutina aplicadas em machos não demonstraram atividade sobre as proteínas séricas dos animais, permanecendo em valores médios de 69,25 mg/dL. Considerando-se o mesmo estudo realizado com as fêmeas, observou-se que o grupo-controle demonstrou 70,28 mg/dL de proteínas no soro sangüíneo, este valor máximo encontrado foi reduzido nos animais tratados com 60 mg de rutina para 58,47 mg/dL (Gráfico 14).

Níveis séricos de proteínas em machos que ingeriram monascus não sofreram modificações em suas médias, permanecendo em todos os grupos no valor de 69,45 mg/dL. Entretanto, o mesmo não foi observado com fêmeas, em que a maior dose do corante repercutiu na elevação máxima de proteínas para 70,57 mg/dL enquanto o grupo sem tratamento se caracterizou na menor estimativa calculada: manteve-se com o valor médio em 64,83 mg/dL de proteínas.

Tabela 4 – Cloro, proteína, TGO e TGP de machos e fêmeas de coelho tratados com diferentes doses de rutina e de monascus

Grupos	Tempo (Dias)	Cloro (mg/dL)		Proteína (g/L)		TGO (UI)		TGP (UI)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Ração	0	103,60 Ab	103,58 Aa	56,06 Ab	53,14 Ab	54,40 Aa	61,60 Aa	88,80 Ba	110,00 Aa
	28	108,78 Aa	106,12 Aa	70,34 Aa	70,64 Aa	50,20 Aa	53,80 Aa	71,24 Aa	77,50 Ab
Ração + 20 mg de rutina	0	104,44 Ab	105,20 Aa	52,64 Bb	60,30 Ab	50,80 Aa	48,60 Aa	41,60 Bb	69,20 Aa
	28	110,32 Aa	105,64 Ba	68,36 Aa	66,64 Aa	69,00 Aa	52,80 Aa	73,00 Aa	73,80 Aa
Ração + 40 mg de rutina	0	102,70 Ab	103,70 Aa	54,30 Ab	53,90 Ab	50,60 Aa	53,60 Aa	63,00 Ba	103,80 Aa
	28	108,66 Aa	105,52 Aa	67,68 Aa	60,72 Ba	45,20 Aa	44,20 Aa	55,40 Ba	77,40 Ab
Ração + 60 mg de rutina	0	104,06 Ab	102,80 Ab	54,42 Ab	55,62 Aa	53,20 Aa	60,00 Aa	74,60 Aa	74,00 Aa
	28	110,80 Aa	107,54 Aa	70,62 Aa	59,50 Ba	41,20 Aa	62,00 Aa	67,00 Aa	75,60 Aa
Ração + 40 mg de monascus	0	103,78 Aa	104,80 Aa	52,94 Ab	53,36 Ab	46,20 Ab	41,60 Ab	54,00 Ab	50,00 Ab
	28	104,00 Aa	107,24 Aa	68,92 Aa	68,38 Aa	80,80 Aa	85,40 Aa	84,80 Aa	71,40 Aa
Ração + 80 mg de monascus	0	105,10 Aa	104,10 Aa	54,70 Ab	55,42 Ab	37,20 Aa	44,40 Aa	63,80 Aa	69,20 Aa
	28	108,06 Aa	103,40 Ba	69,38 Aa	68,70 Aa	47,60 Aa	49,20 Aa	60,00 Aa	64,60 Aa
Ração + 100 mg de monascus	0	104,42 Aa	103,70 Aa	52,34 Ab	53,42 Ab	43,40 Aa	38,40 Aa	40,40 Ab	57,40 Aa
	28	107,60 Aa	106,12 Aa	69,16 Aa	64,22 Aa	47,00 Aa	45,60 Aa	75,00 Aa	67,40 Aa

Em cada característica, cada grupo e cada tempo (linha), A difere de B pelo teste F (P<0,05).
 Em cada característica, cada grupo e cada sexo (coluna), a difere de b pelo teste F (P<0,05).

- *Aspartato aminotransferase (TGO)*

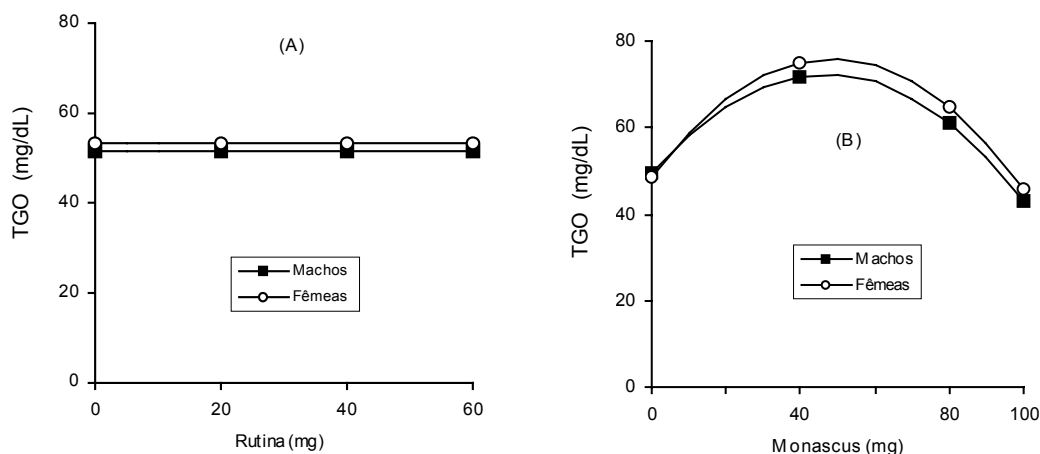
Aspartato aminotransferase (E.C. 2.6.1.1.), também conhecida como transaminase glutâmico oxalacético (TGO) catalisa a reação: ácido oxalacético + ácido glutâmico \leftrightarrow ácido alfa-cetoglutarico + ácido aspártico. TGO é encontrada no fígado, coração, músculos esqueléticos, rins e pâncreas, sendo que o aumento da atividade plasmática da enzima é um indicador de injúrias em células desses tecidos e, ou, órgãos.

Comparando-se machos e fêmeas em todos os grupos e tempos não foram verificadas flutuações estatisticamente significativas para TGO. Entretanto, comparando-se resultados obtidos nos mesmos grupos, monascus em 40 mg alterou de forma estatisticamente significativa em machos (46,20 UI para 80,80 UI) e fêmeas (41,60 UI para 85,40 UI), considerando os tempos 0 e 28 dias respectivamente.

Em humanos os valores normais de TGO variam de 5 a 20 UI/mL (LIMA, 1985). Considerando a variação dentro do nível de normalidade encontrada para o homem e verificando que as doses mais altas de monascus não alteraram significativamente os níveis da enzima, pode-se concluir que mesmo com o aumento atingido de TGO no tratamento de ração + monascus 40 mg, que o corante apresenta ausência de toxicidade em coelhos machos e fêmeas dentro da faixa das doses empregadas no ensaio.

Considerando-se o que se representa no gráfico referente ao tratamento de rotina, as diferentes doses dos flavonóides não interferiram em alterações dos níveis séricos de TGO. Constatando-se o valor médio estimado de 51,40 UI para animais machos e 53,20 UI para as fêmeas.

Análise gráfica indica que o monascus interferiu nos valores normais de TGO quando comparadas ao grupo-controle. Doses diárias estimadas de 46,80 mg sobre machos elevaria os níveis sanguíneos do constituinte para 72,36 UI, enquanto o grupo que submetido à 100 mg diárias apresentava uma estimativa média mínima de 43,04 UI de TGO.



Rutina, machos: $\bar{Y} = 51,40$ UI

Rutina, fêmeas: $\bar{Y} = 53,20$ UI

Monascus, machos: $\hat{Y} = 49,6729 + 0,9697Mo - 0,01036 * Mo^2$ $R^2 = 0,60$

Monascus, fêmeas: $\hat{Y} = 48,6874 + 1,1217Mo - 0,01153 * Mo^2$ $R^2 = 0,58$

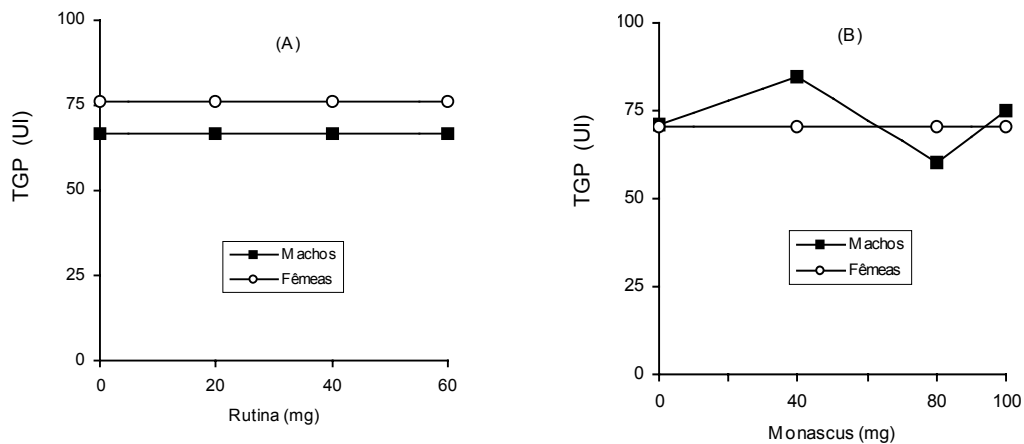
Gráfico 15 – Estimativa do TGO de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

Comportamento semelhante ao que foi citado no parágrafo anterior foi observado em relação ao tratamento sobre indivíduos do sexo feminino. Monascus em sua dose máxima diminuiu o valor normal de TGO para 45,46 UI, enquanto doses estimadas de 48,64 mg de monascus seriam capazes de aumentar a média para 75,97 UI.

- Alanina aminotransferase (TGP)

Alanina aminotransferase (E.C. 2612), também conhecida como transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) catalisa a reação ácido pirúvico + ácido glutâmico \leftrightarrow alanina + ácido alfa-cetoglutárico. TGP é considerada específica para o fígado e seus níveis plasmáticos servem como bons indicadores de injúrias hepáticas. Entretanto, em coelhos, existem altas concentrações de TGP no músculo cardíaco (HOFFMANN et al., 1989).

Entre machos e fêmeas, a Tabela 4 mostra diferenças estatisticamente significativas no grupo-controle e ração + 20 mg de rutina, no início do



Rutina, machos: $\bar{Y} = 66,66$ UI
 Rutina, fêmeas: $\bar{Y} = 76,08$ UI
 Monascus, machos: médias observadas
 Monascus, fêmeas: $\bar{Y} = 70,23$ UI

Gráfico 16 – Estimativa do TGP de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

ensaio. Os grupos de machos e fêmeas submetidos a uma dieta diária de 40 mg do flavonóide apresentaram diferenças significativas nos tempos inicial e final do experimento.

Machos dos grupos que ingeriram 20 mg de rutina, 40 mg de monascus e 100 mg de monascus apresentaram variações estatisticamente significativas de TGP, uma vez que o constituinte aumentou consideravelmente do início ao fim do ensaio.

Fêmeas do grupo-controle apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa do nível sérico da transaminase, assim como o grupo tratado com 40 mg de rutina. Quarenta miligramas (40 mg) de monascus em fêmeas aumentou significativamente o nível sérico de TGP.

Segundo LIMA (1985), em humanos os valores normais de TGP variam entre 5 a 15 U/mL. Assim sendo, a mesma observação realizada quanto aos resultados para TGO pode ser aplicada para transaminase glutâmico-pirúvica, ou seja, podemos observar que não existe toxicidade de rutina e monascus, nas doses empregadas, na alteração dos níveis normais de TGP em coelhos machos e fêmeas.

Valores estimativos constantes para machos e fêmeas em todos os grupos tratados com rotina são observadas. Desta forma, constata-se que para os níveis de TGP para machos mantiveram-se em 66,66UI e para fêmeas 76,08UI (Gráfico 16).

Fêmeas tratadas com monascus também não sofreram variações de TGP no soro, valores médios de 70,23 UI foram calculados para todos os grupos de tratamentos. Quarenta miligramas (40 mg) de monascus aumentou o valor desta transaminase para 84,80 UI, enquanto que o dobro da dose em questão (80 mg) diminuiu para a menor estimativa calculada, ou seja, um valor de 60 UI.

- Fósforo

Analisando-se a Tabela 5 e comparando-se machos e fêmeas, diferenças estatisticamente significativas são verificadas com o grupo ração + 20 mg de rotina, ração + 80 mg de monascus e ração + 100 mg de monascus ao fim do ensaio.

Os valores normais de fósforo em machos foram de 7,37 mg/dL e em fêmeas de 7,29 mg/dL.

Valores normais de fosfato inorgânico em humanos adultos varia de 3,0 a 4,5 mg/dL, sendo que em crianças esses valores aumentam para uma faixa de 4,0 a 6,0 mg/dL.

Fósforo no organismo é primariamente intracelular. Fósforo sérico existe principalmente na forma de fosfato sendo que esses níveis são controlados pela vitamina D, níveis de calcitonina e paratormônio, dieta, balanço ácido-base, e níveis de íons cálcio.

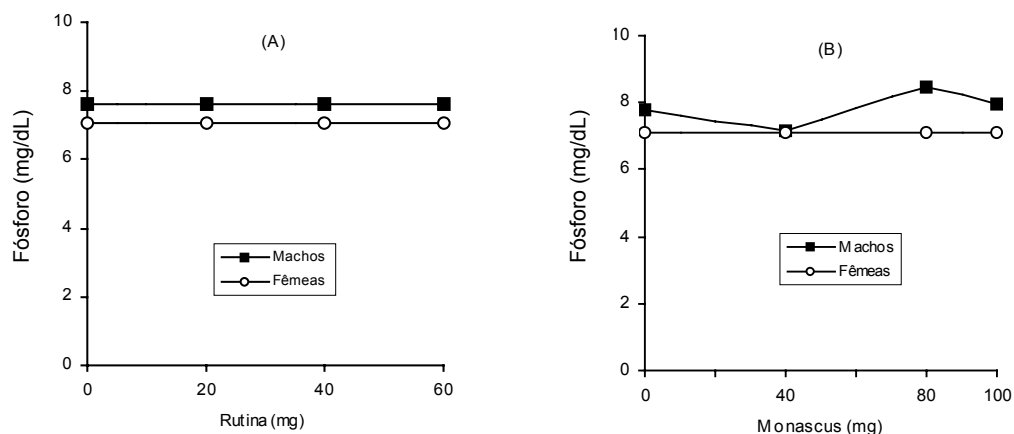
Hiperfosfatemia é verificada na hipervitaminose D, insuficiência renal crônica, hipoparatiroidismo, osteoporose, carcinomas osteolística metastática e acidose láctica. Dentre as patologias responsáveis pela hipofosfatemia destacam-se o raquitismo, o hiperparatiroidismo e o hiperinsulismo.

Os resultados apresentados não representam uma atividade toxicológica a nível fisiológico de rotina ou monascus.

Tabela 5 - Fósforo e cálcio de machos e fêmeas de coelho tratados com diferentes doses de rutina e de monascus

Grupos	Tempo (Dias)	Fósforo (mg/dL)		Cálcio (mg/dL)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Ração	0	7,37 Aa	7,29 Aa	11,30 Ab	11,90 Aa
	28	7,76 Aa	7,00 Aa	13,68 Aa	13,26 Aa
Ração+20 mg de rutina	0	7,48 Aa	7,34 Aa	11,52 Aa	10,94 Ab
	28	8,07 Aa	7,07 Ba	13,04 Aa	12,90 Aa
Ração+40 mg de rutina	0	7,50 Aa	7,55 Aa	11,20 Aa	11,60 Aa
	28	7,06 Aa	7,18 Aa	12,16 Aa	13,26 Aa
Ração+60 mg de rutina	0	7,18 Aa	7,24 Aa	11,78 Aa	11,36 Aa
	28	7,50 Aa	6,99 Aa	12,72 Aa	11,88 Aa
Ração+40 mg de monascus	0	7,35 Aa	7,41 Aa	12,38 Aa	11,68 Aa
	28	7,15 Aa	7,78 Aa	12,26 Aa	12,30 Aa
Ração+80 mg de monascus	0	7,30 Ab	7,20 Aa	10,92 Ab	12,16 Aa
	28	8,49 Aa	6,83 Ba	13,46 Aa	12,68 Aa
Ração+100 mg de monascus	0	7,27 Aa	7,32 Aa	11,68 Aa	11,14 Aa
	28	7,95 Aa	6,83 Ba	12,92 Aa	11,98 Aa

Em cada característica, cada grupo e cada tempo (linha), A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).
Em cada característica, cada grupo e cada sexo (coluna), a difere de b pelo teste F ($P < 0,05$).



Rutina, machos: $\bar{Y} = 7,60$ mg/dL

Rutina, fêmeas: $\bar{Y} = 7,06$ mg/dL

Monascus, machos: médias observadas

Monascus, fêmeas: $\bar{Y} = 7,11$ mg/dL

Gráfico 17 – Estimativa do teor de fósforo de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

Grupos de machos e fêmeas tratados com o flavonóide não obtiveram seus valores médios de fósforo alterados: 7,60 mg/dL para os primeiros e 7,06 mg/dL para os segundos (Gráfico 17).

Níveis séricos de fósforo em fêmeas tratadas com monascus, de acordo com a dose empregada, não obtiveram flutuações nos valores médios do constituinte bioquímico analisado (7,11 mg/dL). Para indivíduos machos a maior média encontrada foi de 8,49 mg/dL no grupo de 80 mg e a menor de 7,11 mg/dL encontrada no grupo cujo os animais ingeriam 40 mg/dia da substância testada (Gráfico 17).

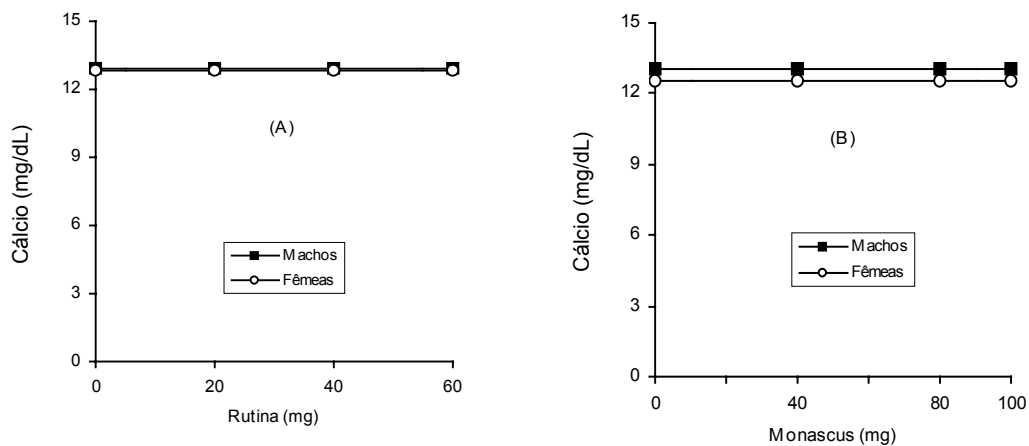
- Cálcio

Cálcio não apresentou alterações estatisticamente significativas em seus níveis séricos, quando comparamos animais machos e fêmeas. Comparando-se dentro de um mesmo grupo, o quadro apresenta que machos tratados com 80 mg do corante natural, assim como o grupo-controle, apresentou diferenças estatisticamente significativas. O grupo de fêmeas submetidas à 20 mg de rutina também tiveram seus níveis de cálcio alterados. Entretanto essas alterações não apresentam significância fisiológica relevante, uma vez que as demais doses empregadas não atuaram em variações significativas nos níveis de cálcio. Fundamentando esta afirmação, pode-se analisar a Tabela 5 e constatar que os valores de cálcio dos grupos-controles, nos tempos inicial e final, se situaram numa faixa próxima dos resultados obtidos em todos os grupos de animais que foram submetidos aos tratamentos.

Coelhos machos do grupo-controle apresentaram no tempo zero uma concentração média de 11,30 mg/dL de cálcio, o grupo de fêmeas apresentavam uma média de 11,90 mg/dL.

Humanos com níveis normais de cálcio no sangue apresentam faixa de 9,0-11,5 mg/dL de cálcio ionizado.

O cálcio em coelhos é absorvido no intestino delgado. Dietas ricas em cálcio acarretam na liberação de urina rica em carbonato de cálcio, sendo que esta excreção de cálcio pela urina do coelho se relaciona pela ausência de controle homeostático dos níveis de cálcio no soro (CHEEKE, 1987).



Rutina, machos: $\bar{Y} = 12,90$ mg/dL

Rutina, fêmeas: $\bar{Y} = 12,83$ mg/dL

Monascus, machos: $\bar{Y} = 13,08$ mg/dL

Monascus, fêmeas: $\bar{Y} = 12,56$ mg/dL

Gráfico 18 – Estimativa do teor de cálcio de machos e fêmeas de coelhos avaliados aos 28 dias, em função de doses de rutina (A) e de monascus (B).

Segundo CHEEKE, (1987), as diferenças existentes entre o coelho e a maioria dos animais com relação ao metabolismo do cálcio pode ser resumida nos seguintes aspectos: a) o animal tem uma alta taxa de absorção de cálcio, que não está regulada com as necessidades metabólicas de utilização deste componente; assim sendo, se explica valores de cálcio nos coelhos acima do encontrado na espécie humana; b) os níveis de cálcio no sangue não estão regulados homeostaticamente e sim guardam relação direta com a concentração de cálcio presente na dieta; c) A fração ultrafiltrável do cálcio presente no sangue é elevada, determinando uma passagem acentuada do constituinte ao rim; d) A principal rota de excreção de cálcio nos coelhos é a urina, o que os diferencia dos outros animais, cuja principal rota de eliminação se dá pela bile.

Analisando-se os gráficos apresentados, conclui-se que não existiram atividades do flavonóide e do corante estudado sobre os animais nas concentrações de cálcio, independentemente da dose e, ou, do grupo considerado. Desta forma, animais machos que sofreram tratamento de

rutina permaneceram com o valor médio constante de 12,90 mg/dL e fêmeas com 12,83 mg/dL no soro sanguíneo, comparando-se com o grupo-controle.

Estimativas de 13,08 mg/dL de cálcio para machos e de 12,56 mg/dL para fêmeas foram obtidos quando calculados para monascus.

5.CONCLUSÃO

Neste experimento, houve ausência de toxicidade com o tratamento com rutina e monascus, indicando que tais compostos apresentam uma boa possibilidade de serem empregados isoladamente ou associados com medicamentos. Entretanto, novos testes de toxicidade, tais como toxicidade reprodutiva, teratogênicos, testes de genotoxicidade, dentre outros, ainda devem ser efetuados, além de outras pesquisas para se descobrir novas aplicabilidades farmacológicas de tais compostos.

Uma importante ressalva deve ser feita quando analisa-se que testes em animais são considerados pré-clínicos. Desta forma, estudos clínicos em humanos tornam-se fundamentais e imprescindíveis para se certificar dos resultados encontrados na avaliação toxicológica encontrada na presente dissertação, viabilizando, desta forma, o emprego das substâncias testadas como fármacos.

2. CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos desenvolvidos nesta dissertação apresentaram resultados promissores quanto a utilização de produtos naturais, como flavonóides e corantes, no tratamento e na prevenção de patologias. Faz-se necessária a realização de pesquisas que determinem mecanismos de ação destas substâncias, uma vez que as informações decorrentes destes estudos são cruciais na explicação dos resultados obtidos nos ensaios realizados na preparação deste trabalho.

Associações de flavonóides com medicamentos podem atuar numa melhor eficácia do medicamento, esta afirmação se fundamenta na atividade sinérgica encontrada entre chitosan e naringenina no controle lipídico em coelhos hiperlipidêmicos. Rutina e monascus nas doses empregadas, aparentemente, não devem colocar em risco a saúde humana. Após novos estudos serem realizados sobre potenciais toxicológicos e farmacológicos destes compostos, far-se-ão necessários estudos clínicos em humanos para poder se divulgar a utilidade de rutina e monascus como medicamentos, a mesma observação é valiosa para naringenina, uma vez que o chitosan já vem sendo utilizado como medicamento na redução de peso e de colesterol sanguíneo em humanos.

Pode-se concluir ainda que as substâncias testadas não foram tóxicas, nas doses empregadas, para o metabolismo de proteínas, minerais, lipídios e glicose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGULLO, G., GAMET-PAYRASTRE, L., MANETI, S., VIALA, C., RÉMÉSY, C., CHAP, H., PAYRASTRE, B. Relationship between flavonoids structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-Kinase: A comparison with tyrosinase and protein kinase e inhibition. **Biochemical Pharmacology**, v.53, p.1649-1657, 1997.
- ANIYA, Y., YOKOMAKURA, T., YONAMINE, M., SHIMADA, K. NAGAMINE, T., SHIMABUKURO, M., GIBO, H. Screening of antioxidant action of various molds and protection of *Monascus anka* against experimentally induced liver injuries of rats. **Gen. Pharmacol.**, v.32, n.2, p.225-231, 1999.
- ANTON, R , BERETZ, A. Flavonoids: antithrombotic agents or nutrientes? **Bull. Acad. Natle. Méd.**, v.174, n.6, p.709-714, 1990.
- BATLOUNI, M. Hipótese oxidativa da aterosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronariana. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.68, p.55-61, 1997.
- BLANC, P.J., LAUSSAC, J.P., LE BARS, P., LORET, M.O., PAIRELLEUX, A., PROMÉ, D., PROMÉ, J.C. SANTERRE, A.L.; GOMA, G. Characterization of monascidin A from *Monascus as citrinin*. **Int. J. Food Microbiol.**, v.27, p.201-213, 1995.
- BOREL, J. P., MAQUART, F.X., VALEYRE, J., PEUCH, L.C., RONDOUSE, A. **Bioquímica Dinâmica**. Ed. Panamericana, 1987. 800p.

- BORTOLOTTI, A., CASTELLI, D., BONATI, M. Hematology and some chemistry values of adult, pregnant and newborn New Zeland White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Lab Anim. Sci.**, v.39, p.437-439, 1989.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde. Doenças cardiovasculares no Brasil. **Ciência Hoje**, v.103, 1994. (Informe publicitário).
- BRITO, A.S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas-SP: Editora da Unicamp, 1994.
- CHEEKE, P.R. **Alimentación y nutrición del conejo**. Editora Acríbia, S.A., 1995, 429p.
- CHOI, J.S., YOKOSAWA, T., OURA, H. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*. **J. Natural Products**, v.54, n.1, p.218-224, 1991.
- EVANS, A.J., HOOD, R.L., OAKEMFULL, D.G., SIDHU, G.S. Relationship between structure and function of dietary fiber: a comparative study of the effects of three galactomannans on cholesterol metabolism in rat. **Brazil Journal. Nutr.**, v.68, p.217-229, 1992.
- FEINLEB, M. The magnitude and nature of the decrease in coronary artery disease mortality rate. **American Journal of Cardiology**, v.54, p 2c-6c, 1984.
- FEKETE, S. Cholesterol, atherosclerosis and rabbits. **J. Appl. Rabbit Res.**, v.14, p.77-79, 1991.
- FIELDING, B.C., HOLKER, J.S.E., JONES, D.F., POWELL, A.D.G., RICHMOND, K.W., ROBERTSON, A., WHALLEY, W.B. The chemistry of fungi. Part 39. The structure of monascin. **J. Chem. Soc.**, v.1961, p.457-459, 1961.
- FINK-GREMMELS, J., HENNING, A., LEITSNER, L. Studies on cytotoxicity and genotoxicity of a *Monascus* extract. **Mitteilungsbl. Bundesanst. Fleischforsch. Kulmb.**, n.111, p.38-44, 1991.
- FINK-GREMMELS, J., LEITSNER, L. Biological effects of *Monascus purpureus*. **Fleischwirtsch**, v.69, n.1, p.115-122, 1989.
- FORMICA, J.V., REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chem. Toxic.**, v.33, n.12, p.1061-1080, 1995.

- GODERHAM, M.J., ADLERCREVTZ, H., OJALA, S.T., WAHALA, K., HOLUB, B.J. Asoy protein ilokate rich in genistein and daidzein and its effects on plasm isoflavone concentrations, platelet agregation, bood lipids and fatty acid composition of plasm phospholipid in normal men. **The Journal of Nutrition**, v.126, n.8, 1996.
- GOTTO, M.A. Alterações nos lipídios e lipoproteínas. **Compêndio de Cardiologia Preventiva**, Fascículo 2, 1997. p 107-129.
- HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Conduita Terapêutica por Exames Laboratoriais**. 16.ed, 1982. p.226-228,
- HOFFMANN, W.E., KRAMMER, J., MAIN A.R., TORRES, J.L. Clinical enzymology. In: LOEB, W.F., QUIMBY, F.W. (Eds.) **The Clinical Chemistry of Laboratory Animals**. New York: Pergamon, 1989. p.237-278.
- IDE, T., MORIUCHI, H., NIHIMOTO, K . Hypolipidemic effect of guar gum and its enzyme hidrolysate in rats fed higly saturated fat diets. **Ann. Nutr. Metab.**, v.35, p.34-44, 1991.
- ITAYA, S., IGARASHI, K. Effects of Taxifolin on the Serum Cholesterol level in rats. **Biosc. Biotech. Biochem.**, v.56, n.9, p.1942-1494, 1992.
- IZZO, A.A, DI CARLO, G., MASCOLO, N., CAPASSO, F. Antiulcer effect of flavonoids. Role of endogenous PAF. **Phytoterapy Research**, v.8, p.179-181, 1994.
- JAHN, A. Evaluation of genotoxicity of a *Monascus* extract by trhee *in vitro* tests. **Mitteilungsbl. Bundesanst. Fleischforsch. Kulmb.**, Bonn, n.114, p.379-387, 1991.
- JONES, P.H., PATSCH, J., GOTTO J.A.M. The biochemistry of blood lipid regulation and the assessment of lipid abnormalities. In: SCHLANT, R.C., ALEXANDER, R.W. (Eds.): **The heart arteries and viens**.8.ed. New York: McGraw-Hill, 1994. p.973-987.
- KOEHRLE, J., AUF'MKOLK, M.D., MATTHIAS, S., KLAUS, I., CODY, V., HESCH, R. D. Iodothyronine deiodinase is inhibited by plant flavonoids. Plant flavonoids in Biology and Medicine: **Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships**. Alan R. Liss. Inc. p.359-371, 1986.
- KOES, R.E., QUATTROCCHIO, F., MOL, J.N.M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. **Bioessays** ,v.16, n.12, p.123-132, 1994.

- KOIDE, S.S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. **Nutr. Research**, v.18, p.1091-1101, 1998.
- KOZMA, C., MACKLIN, W., CUMMINS, L.M., MAUER, R. The anatomy, physiology and biochemistry of the rabbits. In: WEISBROTH, S.H., FLATT, R.E., KRAUS, A.L. (Eds.) **The biology of the Laboratory Rabbit**. New York: Academy Press, 1974. p.50-72.
- KUHLMANN, M.K, KORSCH, E., BURKHARDT, G., WAGNER, M., KÖHLER, H. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. **Arch Toxicol.**, v.72, n.8, p.536-540, 1998.
- LAIRD, C.W., FOX, R.R. The effect of age on cholesterol and PBI levels in the III/IIIc hybrid rabbit. **Life Sci.**, v.9, p.1243-1253, 1970.
- LANNI, C., BECKER, E.L. Inhibition of neutrophil phospholipase A2 by p-bromophenylacetyl bromide, nordihydroguaiaretic acid 5,8,11,14 eicosatetraenoic acid and quercetin. **Int. Archs. Allergy Appl. Immun.**, v.76, n.214, 1985.
- LE HOUX, J.G., GRODIN, F. Some effects of chitosan on liver function in the rat. **Endocrinology**, v.132, n.3, p.1078-1084, 1993.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.
- LEITE, J.I.A. **Mecanismo de ação de goma guar sobre o metabolismo do colesterol**. Belo Horizonte: UFMG, 1993. 124p. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1993.
- LEITE, P.F. **Risco cardiovascular: fatores metabólicos e nutricionais: diagnóstico e tratamento**. Editora Acta Médica Ltda., 1994. 175p.
- LIMA, A.O., SOARES, B.J., GRECO, J.B., GALLIZI., CANÇADO, J.R. **Métodos de laboratório aplicados a técnicas e interpretação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6.ed., 1985. 382p.
- LIPID RESEARCH CLINICS CORONARY PRIMARY PREVENTION TRIAL RESULTS. **Reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering**. *Ibid.* b, 251, p.365-374, 1984.
- LOPES, R.M., OLIVEIRA, T.T., NAGEM, T.J., PINTO, A.S. Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.17, p.18-22, 2000.

- MAEZAKI, Y., TSUJI, K., NAKAGAWA, Y. Hypocholesterolemic effects of chitosan in adult males. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.57, p.1439-1444, 1993.
- MANGIAPANE, H., THOMPSON, J, SLATER, A., BROWN, S., BELL, G.D. 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.
- MASCARENHAS, J.M.O. **Uso, restrições e perspectivas dos corantes utilizados em alimentos**. Viçosa, MG: UFV, 1997, 155p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- 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. **Journal. Nutrition**, v.84, p.201-204, 1964.
- MELLO, H.V., SILVA, J.F. **A criação de coelhos**. 2.ed. Editora Globo, 1989, 214p.
- MITRUKA, B.M., RAWNSLEY, H.M. **Clinical biochemical and hematological references value in normal experimental animals and normal humans**. 2.ed. New York: Masson, 1981.
- 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. **Biochemical Pharmacology**, v.45, p.13-19, 1993.
- MUNÓZ, M.E., GONZÁLEZ, J., ESTELLER, A. Bile pigment formation and excretion in the rabbit. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.85, p.67-71, 1986.
- OLIVEIRA, T.T., NAGEM, T.J., MIRANDA, L.C.G., PAULA, V.F., TEIXEIRA, M.A inhibitory action on aldose reductase by soybean flavonoids. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.8, n.3, p.211-213, 1997.
- OLSEN, R., SCHWATZMILLER, W.W. Biomedical applications of chitin and its derivatives. **Physical Properties and Application**, p.813-828, 1989.
- PÉGORIER, J.P., DUÉE, P.H., GIRARD, J.R. Contribution of hepatic fatty acid oxidation and exogenous galactose supply to regulation of glucose homeostasis in the newborn rabbit. **Biol. Neonate.**, v.51, p.31-39. 1987.
- PETERSON, J , DWYER J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v.18, n.12, p.1995-2018, 1998.

- QUINTÃO, E., NAKANDADARE, E.R. **Manual de referência em dislipidemias**. São Paulo, 1992. 106p.
- RAGAN, H.A. Markers of renal function and injury. In: LOEB, W.F., QUIMBLY, F.W. (Eds.) **The clinical chemistry of laboratory animals**. New York: Pergamon, p.321-344. 1989.
- RATTY, A.K., DAS, P.N. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, n.39, p.69-79, 1988.
- ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis. **N. Engl. J. Med.**, n.314, p.488-500, 1986.
- SADZUKA, Y., SUGIYAMA, T., SHIMOI K., KINAE, N., HIROTA, S. Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Toxicology Letters**, v.92, n.1, p.1-7, 1997.
- SHARMA, R.D. Effect of various isoflavones on lipid levels in triton treated rats. **Atherosclerosis**, v.33, p.371-375, 1979.
- SIDDIQUI, M.T., SIDDIQUI, M. Hypolipidemic principles of cicer arietinum: biochanin A and formonetin. **Lipids**, v.11, n.3, 1975.
- SMITH, U., HOLM, G. Effect of a modified guar gum preparation on glucose and lipid levels in diabetics and health volunteers. **Atherosclerosis**, v.45, p.1-10, 1982.
- SPILLER, G.A., FARQUAR, J.W., GATES, J.E., NICHOLS, S.F. Guar gum and plasma cholesterol. Effect of guar gum and oat fiber source on plasma lipoprotein and cholesterol in hypercholesterolemic adults. **Atherosclerosis and Thrombosis**, v.11, p.1204-1208, 1991.
- TUOMILEHTO, J., SILVASTI, M., MANNINEM, V., UUSITUPA, M., ARO, A. Guar gum and gemfibrozil: an effective combination in the treatment of hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v.76, p.71-77, 1989.
- TURNER, P.R., TUOMILEHTO, J.L., HAPONEM, P., LA VILLE, A.E., SHAIKA, M., LEWIS, B. Metabolic studies on the hypolipidemic effect of guar gum. **Atherosclerosis**, v.81, p.145-150, 1996.
- UMA DEVI, P., GANASOUNDARI, A., RAO, B.S., SRINIVASAN, K.K. In vivo radioprotection by ocimum flavonoids: Survival of mice. **Radiat Res.**, v.151, n.1, p.74-78, 1999.

VALENTE, S.T.X. **Efeito de corantes naturais nos níveis de colesterol e triacilgliceróis séricos em ratos hiperlipidêmicos.** Viçosa: UFV, 1998. 102p.Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.

VILAR, S.M.; MAAS RF,. FINK-GREEML, J. Mutagenicity of Monascus fermentation products and the role of citrinin contamination. **Mutat. Resear.** V.444, n.1, p.7-16, 1999.

WILLIAMS, C.H., HOULT, J.R.,S., HARBONE, J.B., GREENHAM, J., EAGLES, J. A biologically active lipophilic flavonol from tanacetum parthenium. **Phytochemistry**, v.38, p.267-270, 1995.

YOKOZAWA et al Antioxidative activy of flavones and flavonois in vitro. **Phitoterapy Research**, v.11. p.440-446, 1999.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Tabela 1A – Significância da estatística F de diferentes fontes e coeficiente de variação experimental (CV) para características do soro de machos e fêmeas de coelhos tratados com diferentes doses de rutina e de monascus e avaliados no início do experimento e após 28 dias

Característica	T	S	G	T x S	T x G	S x G	T x S x G	CV (%)
Ganho de peso	-	ns		ns	-	ns	-	22,47
Colesterol total	**	**	ns	**	ns	ns	ns	20,15
Colesterol-HDL	Ns	**	ns	ns	*	**	ns	19,11
Triacilgliceróis	**	ns	ns	**	ns	ns	ns	20,52
Albumina	Ns	**	*	**	ns	ns	ns	4,20
Creatinina	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	13,86
Uréia	Ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	14,02
Ácido úrico	Ns	ns	ns	*	*	ns	**	27,30
Glicose	Ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	5,74
Gama-GT	Ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	33,37
Bilirrubina direta	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	56,80
Bilirrubina total	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	28,93
Cloro	**	*	ns	*	ns	ns	ns	2,61
Proteína	**	ns	ns	**	ns	ns	ns	7,32
TGO	*	ns	*	ns	**	ns	ns	35,89
TGP	Ns	**	**	*	**	**	ns	22,01
Fósforo	Ns	**	ns	*	ns	ns	ns	9,51
Cálcio	**	Ns	ns	ns	ns	ns	Ns	12,23

** Significativo pelo teste F (P < 0,01).

* Significativo pelo teste F (P < 0,05).

ns Não-significativo pelo teste F (P > 0,05).

T = tempo (dias); S = Sexo (machos e fêmeas) e G = grupos tratados com rutina e monascus.

Tabela 2A – Desdobramento de sexo dentro de tempo e de grupo para o colesterol total, colesterol-HDL, albumina, creatinina, uréia, ácido úrico e glicose do soro de machos e fêmeas coelhos submetidos a dietas com diferentes doses de rutina e de monascus e avaliados no início do experimento e aos 28 dias

FV	GL	Quadrado Médio							
		Colesterol	Colesterol-HDL	Triacilgliceróis	Albumina	Creatinina	Uréia	Ácido úrico	Glicose
S/ tempo 0 e grupo 1	1	17.489,1300 **	150,5440 ns	846,4000 ns	0,2465 *	0,0102 ns	2,6010 ns	0,000090 ns	5,7760 ns
S/ tempo 0 e grupo 2	1	22.090,0000 **	38,0250 ns	123,2010 ns	0,0116 ns	0,0062 ns	0,4000 ns	0,000010 ns	8,4640 ns
S/ tempo 0 e grupo 3	1	15.984,0100 **	8,8360 ns	577,6000 ns	0,0040 ns	0,0176 ns	1,8490 ns	0,000040 ns	15,6250 ns
S/ tempo 0 e grupo 4	1	20.784,4800 **	12,7690 ns	3.426,2010 *	0,0001 ns	0,0548 ns	7,3960 ns	0,000040 ns	42,4360 ns
S/ tempo 0 e grupo 5	1	20.620,6800 **	148,2250 ns	260,1000 ns	0,0292 ns	0,0130 ns	2,9160 ns	0,001000 ns	32,4000 ns
S/ tempo 0 e grupo 6	1	17.147,8800 **	357,6039 **	577,6000 ns	0,0026 ns	0,0476 ns	4,0960 ns	0,002250 ns	12,3210 ns
S/ tempo 0 e grupo 7	1	20.061,4500 **	101,1240 ns	1.000,0000 ns	0,0230 ns	0,0036 ns	5,4760 ns	0,002250 ns	2,8090 ns
S/ tempo 28 e grupo 1	1	22.061,8100 **	276,6760 *	770,8841 ns	0,1300 ns	0,1277 *	185,7610 **	0,001000 ns	128,1639 ns
S/ tempo 28 e grupo 2	1	5.822,5670 **	164,8360 ns	2,0250 ns	0,1061 ns	0,0230 ns	0,0090 ns	0,000250 ns	2,5000 ns
S/ tempo 28 e grupo 3	1	4.368,1000 **	43,0562 ns	1.713,4810 ns	0,0922 ns	0,1369 *	141,9782 **	0,001000 ns	2,8090 ns
S/ tempo 28 e grupo 4	1	5.175,6260 **	0,0010 ns	3.161,2830 *	0,3098 *	0,0002 ns	1,3690 ns	0,000010 ns	68,1209 ns
S/ tempo 28 e grupo 5	1	7.017,2030 **	166,4640 ns	2.059,2250 ns	0,0212 ns	0,0774 ns	0,1960 ns	0,000490 ns	21,7563 ns
S/ tempo 28 e grupo 6	1	15.101,0000 **	1.020,1000 **	1.406,5970 ns	0,0941 ns	0,0270 ns	5,6250 ns	0,030250 **	54,7559 ns
S/ tempo 28 e grupo 7	1	12.411,5300 **	419,9039 **	1.304,1640 ns	0,1124 ns	0,0130 ns	2,6729 ns	0,005290 ns	5,9290 ns
Resíduo	112	460,7317	48,0726	757,0778	0,0362	0,0302	17,2701	0,001389	66,9859

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 3A – Desdobramento de sexo dentro de tempo e de grupo para gama-GT, bilirrubina direta e total, clorofila, proteína, TGO, TGP, fósforo e cálcio do soro de machos e fêmeas de coelhos submetidos a dietas com diferentes doses de rutina e de monascus e avaliados no início do experimento e aos 28 dias

FV	GL	Quadrado Médio								
		Gama-GT	Bilirrubina direta	Bilirrubina total	Clorofila	Proteína	TGO	TGP	Fósforo	Cálcio
S/ tempo 0 e grupo 1	1	1,6000 ns	0,000010 ns	0,001210 ns	0,0010 ns	21,3160 ns	129,6000 ns	1.123,6000 *	0,0185 ns	0,9000 ns
S/ tempo 0 e grupo 2	1	0,9000 ns	0,000010 ns	0,001000 ns	1,4440 ns	146,6890 **	12,1000 ns	1.904,4000 **	0,0504 ns	0,8410 ns
S/ tempo 0 e grupo 3	1	1,6000 ns	0,000360 ns	0,000640 ns	2,5000 ns	0,4000 ns	22,5000 ns	4.161,6000 **	0,0053 ns	0,4000 ns
S/ tempo 0 e grupo 4	1	2,5000 ns	0,000360 ns	0,001000 ns	3,9690 ns	3,6000 ns	115,6000 ns	0,9000 ns	0,0090 ns	0,4410 ns
S/ tempo 0 e grupo 5	1	0,4000 ns	0,000040 ns	0,001690 ns	2,6010 ns	0,4410 ns	52,9000 ns	40,0000 ns	0,0078 ns	1,2250 ns
S/ tempo 0 e grupo 6	1	0,1000 ns	0,000001 ns	0,001960 ns	2,5000 ns	1,2960 ns	129,6000 ns	72,9000 ns	0,0240 ns	3,8440 ns
S/ tempo 0 e grupo 7	1	2,5000 ns	0,000040 ns	0,004840 ns	1,2960 ns	2,9160 ns	62,5000 ns	722,5000 ns	0,0068 ns	0,7290 ns
S/ tempo 28 e grupo 1	1	4,9000 ns	0,000490 ns	0,008410 ns	17,6890 ns	0,2250 ns	32,4000 ns	97,9690 ns	1,4516 ns	0,4410 ns
S/ tempo 28 e grupo 2	1	2,5000 ns	0,001440 ns	0,015210 ns	54,7560 **	7,3960 ns	656,1000 ns	1,6000 ns	2,4900 *	0,0490 ns
S/ tempo 28 e grupo 3	1	1,6000 ns	0,000010 ns	0,000010 ns	24,6490 ns	121,2432 *	2,5000 ns	1.210,0000 *	0,0360 ns	3,0250 ns
S/ tempo 28 e grupo 4	1	1,6000 ns	0,000001 ns	0,000090 ns	26,5690 ns	309,1360 **	1.081,6000 ns	184,9000 ns	0,6503 ns	1,7640 ns
S/ tempo 28 e grupo 5	1	8,1000 ns	0,000810 ns	0,000360 ns	26,2440 ns	0,7290 ns	52,9000 ns	448,9000 ns	0,9923 ns	0,0040 ns
S/ tempo 28 e grupo 6	1	0,9000 ns	0,000090 ns	0,015210 ns	54,2890 **	1,1560 ns	6,4000 ns	52,9000 ns	6,8890 **	1,5210 ns
S/ tempo 28 e grupo 7	1	0,4000 ns	0,000010 ns	0,001690 ns	5,4760 ns	61,0090 ns	4,9000 ns	144,4000 ns	3,1810 *	2,2090 ns
Resíduo	112	10,0786	0,000599	0,005596	7,6061	19,8836	349,2499	235,9942	0,4918	2,2073

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 4A – Desdobramento de tempo dentro de sexo e de grupo para o colesterol total, colesterol-HDL, albumina, creatinina, uréia, ácido úrico e glicose do soro de machos e fêmeas coelhos submetidos a dietas com diferentes doses de rutina e de monascus e avaliados no início do experimento e aos 28 dias

FV	GL	Quadrado Médio							
		Colesterol	Colesterol-HDL	Triacilgliceróis	Albumina	Creatinina	Uréia	Ácido úrico	Glicose
T/ machos e grupo 1	1	9,0250 ns	8,8360 ns	0,0040 ns	0,0160 ns	0,3098 **	0,4840 ns	0,000810 ns	186,6240 ns
T/ machos e grupo 2	1	130,3210 ns	302,4999 *	1.247,6890 ns	0,0084 ns	0,0053 ns	2,0250 ns	0,001210 ns	11,4490 ns
T/ machos e grupo 3	1	4,9000 ns	13,3403 ns	292,6811 ns	0,0168 ns	0,0096 ns	13,1790 ns	0,000010 ns	0,3610 ns
T/ machos e grupo 4	1	32,4000 ns	14,6410 ns	826,2810 ns	0,0846 ns	0,0410 ns	0,0160 ns	0,000090 ns	25,9210 ns
T/ machos e grupo 5	1	620,9439 ns	0,1960 ns	161,6040 ns	0,0260 ns	0,0706 ns	5,3290 ns	0,000810 ns	3,4223 ns
T/ machos e grupo 6	1	184,0410 ns	0,0640 ns	22,5000 ns	0,2372 *	0,1040 ns	0,0360 ns	0,039690 **	33,8559 ns
T/ machos e grupo 7	1	189,2250 ns	198,0250 *	8,1000 ns	0,0608 ns	0,1369 *	19,5161 ns	0,003610 ns	7,5690 ns
T/ fêmeas e grupo 1	1	176,4001 ns	1,9360 ns	1,6000 ns	0,0689 ns	0,0096 ns	161,6040 **	0,000160 ns	22,5000 ns
T/ fêmeas e grupo 2	1	7.011,9030 **	114,9210 ns	2.024,9300 ns	0,1166 ns	0,0922 ns	0,4840 ns	0,002890 ns	22,2010 ns
T/ fêmeas e grupo 3	1	3.378,2450 **	0,0040 ns	2.334,7840 ns	0,1369 ns	0,0194 ns	47,9610 ns	0,000490 ns	2,8090 ns
T/ fêmeas e grupo 4	1	6.071,2960 **	55,2250 ns	7.398,4000 **	0,0757 ns	0,0003 ns	2,0250 ns	0,000160 ns	11,2361 ns
T/ fêmeas e grupo 5	1	7.182,4020 **	1,3690 ns	5.508,4100 **	0,0348 ns	0,1850 *	0,0250 ns	0,000360 ns	0,6760 ns
T/ fêmeas e grupo 6	1	467,8560 ns	163,2160 ns	3.225,6160 *	0,0168 ns	0,0723 ns	0,0250 ns	0,000490 ns	3,7210 ns
T/ fêmeas e grupo 7	1	1.934,8810 *	13,2250 ns	4.981,8240 *	0,0578 ns	0,1000 ns	0,1960 ns	0,003610 ns	12,3210 ns
Resíduo	112	460,7317	48,0726	757,0778	0,0362	0,0302	17,2701	0,001389	66,9859

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 5A – Desdobramento de tempo dentro de sexo e de grupo para gama-GT, bilirrubina direta e total, clorofila, proteína, TGO, TGP, fósforo e cálcio do soro de machos e fêmeas de coelhos submetidos a dietas com diferentes doses de rutina e de monascus e avaliados no início do experimento e aos 28 dias

FV	GL	Quadrado Médio								
		Gama-GT	Bilirrubina direta	Bilirrubina total	Clorofila	Proteína	TGO	TGP	Fósforo	Cálcio
T/ machos e grupo 1	1	6,4000 ns	0,000090 ns	0,000810 ns	67,0810 **	509,7960 **	44,1000 ns	770,8841 ns	0,3803 ns	14,1610 *
T/ machos e grupo 2	1	0,1000 ns	0,000160 ns	0,005290 ns	86,4361 **	617,7961 **	828,1000 ns	2.464,9000 **	0,8821 ns	5,7760 ns
T/ machos e grupo 3	1	2,5000 ns	0,000160 ns	0,002250 ns	88,8040 **	447,8286 **	72,9000 ns	144,4000 ns	0,4840 ns	2,3040 ns
T/ machos e grupo 4	1	1,6000 ns	0,000040 ns	0,007840 ns	113,5690 **	656,1000 **	360,0000 ns	144,4000 ns	0,2528 ns	2,2090 ns
T/ machos e grupo 5	1	0,1000 ns	0,000090 ns	0,006760 ns	0,1210 ns	638,4009 **	2.992,9000 **	2.371,6010 **	0,0980 ns	0,0360 ns
T/ machos e grupo 6	1	0,4000 ns	0,000810 ns	0,019360 ns	21,9040 ns	538,7559 **	270,4000 ns	36,1000 ns	3,5403 **	16,1290 **
T/ machos e grupo 7	1	3,6000 ns	0,000090 ns	0,046240 **	25,2810 ns	707,2808 **	32,4000 ns	2.992,9010 **	1,1696 ns	3,8440 ns
T/ fêmeas e grupo 1	1	0,9000 ns	0,001210 ns	0,007290 ns	16,1290 ns	765,6250 **	152,1000 ns	2.640,6250 **	0,2045 ns	4,6240 ns
T/ fêmeas e grupo 2	1	0,1000 ns	0,002890 *	0,000360 ns	0,4840 ns	100,4890 *	44,1000 ns	52,9000 ns	0,1716 ns	9,6040 *
T/ fêmeas e grupo 3	1	0,9000 ns	0,000090 ns	0,000640 ns	8,2810 ns	116,2810 *	220,9000 ns	1.742,4000 **	0,3349 ns	6,8890 ns
T/ fêmeas e grupo 4	1	2,5000 ns	0,000160 ns	0,002250 ns	56,1690 **	37,6360 ns	10,0000 ns	6,4000 ns	0,1588 ns	0,6760 ns
T/ fêmeas e grupo 5	1	6,4000 ns	0,001960 ns	0,010890 ns	14,8840 ns	564,0011 **	4.796,1000 **	1.144,9000 *	0,3534 ns	0,9610 ns
T/ fêmeas e grupo 6	1	0,4000 ns	0,000360 ns	0,047610 **	1,2250 ns	440,8960 **	57,6000 ns	52,9000 ns	0,3460 ns	0,6760 ns
T/ fêmeas e grupo 7	1	0,9000 ns	0,000360 ns	0,059290 **	14,6410 ns	291,6001 **	129,6000 ns	250,0000 ns	0,6150 ns	1,7640 ns
Resíduo	112	10,0786	0,000599	0,005596	7,6061	19,8836	349,2499	235,9942	0,4918	2,2073

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 6A – Desdobramento do efeito de rotina dentro de tempo e de sexo para o colesterol total, colesterol-HDL, albumina, creatinina, uréia, ácido úrico e glicose do soro de machos e fêmeas coelhos submetidos a dietas com diferentes doses de rotina e de monascus e avaliados no início do experimento e aos 28 dias

FV	GL	Quadrado Médio							
		Colesterol	Colesterol-HDL	Triacilgliceróis	Albumina	Creatinina	Uréia	Ácido úrico	Glicose
Rutina/ Tempo 0, machos	3	7,5927 ns	2,3880 ns	565,3205 ns	0,0223 ns	0,004000 ns	6,0605 ns	0,000032 ns	13,2193 ns
Rutina/ Tempo 0, fêmeas	3	181,1405 ns	89,0933 ns	27,2205 ns	0,1053 *	0,017100 ns	1,2032 ns	0,000098 ns	79,2258 ns
Rutina/ Tempo 28, machos	(3)	80,5240 ns	129,8225 *	569,8094 ns	0,0396 ns	0,131187 **	12,7921 ns	0,000498 ns	21,1005 ns
Linear	1	6,7600 ns	111,4081 ns	197,6837 ns	0,0225 ns	0,178084 *	2,9998 ns	0,000529 ns	31,4721 ns
Quadrático	1	0,7220 ns	206,4031 *	23,3280 ns	0,0562 ns	0,208080 **	8,2947 ns	0,000125 ns	29,0405 ns
Desvio	1	234,0900 ns	71,6563 ns	1.488,4180 ns	0,0400 ns	0,007396 ns	27,0816 ns	0,000841 ns	2,7889 ns
Rutina/ Tempo 28, fêmeas	(3)	3.335,1300 **	88,7793 ns	2.345,2460 *	0,0410 ns	0,007938 ns	67,2259 *	0,000938 ns	29,9111 ns
Linear	1	6.160,6780 **	51,5524 ns	6.266,3060 **	0,1082 ns	0,000001 ns	72,4201 *	0,000081 ns	2,7889 ns
Quadrático	1	2.954,8810 *	154,5680 ns	168,2001 ns	0,0011 ns	0,023805 ns	11,1005 ns	0,002205 ns	72,5804 ns
Desvio	1	889,8327 ns	60,2175 ns	601,2314 ns	0,0137 ns	0,000009 ns	118,1568 *	0,000529 ns	14,3641 ns
Resíduo	112	460,7317	48,0726	757,0778	0,0362	0,0302	17,2701	0,001389	66,9859

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 7A – Desdobramento do efeito de rotina dentro de tempo e de sexo para gama-GT, bilirrubina direta e total, clorofila, proteína, TGO, TGP, fósforo e cálcio do soro de machos e fêmeas de coelhos submetidos a dietas com diferentes doses de rotina e de monascus e avaliados no início do experimento e aos 28 dias

FV	GL	Quadrado Médio								
		Gama-GT	Bilirrubina direta	Bilirrubina total	Clorofila	Proteína	TGO	TGP	Fósforo	Cálcio
Rutina/ Tempo 0, machos	3	26,9833 ns	0,000287 ns	0,001907 ns	2,8120 ns	9,7592 ns	17,2500 ns	1.990,2670 **	0,1083 ns	0,3313 ns
Rutina/ Tempo 0, fêmeas	3	21,1167 ns	0,000173 ns	0,001605 ns	5,0280 ns	51,5893 ns	179,7833 ns	2.128,0500 **	0,0939 ns	0,8220 ns
Rutina/ Tempo 28, machos	(3)	18,1833 ns	0,000045 ns	0,003898 ns	5,8467 ns	10,5158 ns	756,1330 ns	313,4586 ns	0,9112 ns	2,0133 ns
Linear	1	28,0900 ns	0,000049 ns	0,000121 ns	4,8400 ns	0,0067 ns	645,1599 ns	229,8255 ns	0,8100 ns	3,5344 ns
Quadrático	1	11,2500 ns	0,000005 ns	0,000125 ns	0,4500 ns	30,2088 ns	649,7995 ns	121,0320 ns	0,0192 ns	1,8000 ns
Desvio	1	15,2100 ns	0,000081 ns	0,010442 ns	12,2500 ns	1,3317 ns	973,4399 ns	589,5183 ns	1,9044 ns	0,7056 ns
Rutina/ Tempo 28, fêmeas	(3)	25,7833 ns	0,000845 ns	0,009285 ns	4,2965 ns	135,8419 **	264,9333 ns	15,3125 ns	0,0406 ns	2,1285 ns
Linear	1	59,2900 *	0,000729 ns	0,002025 ns	4,2849 ns	386,9089 **	64,0000 ns	1,1025 ns	0,0014 ns	3,5721 ns
Quadrático	1	18,0500 ns	0,000125 ns	0,023805 *	7,8125 ns	9,6605 ns	441,8000 ns	4,5125 ns	0,0911 ns	1,3005 ns
Desvio	1	0,0100 ns	0,001681 ns	0,002025 ns	0,7921 ns	10,9560 ns	289,0003 ns	40,3225 ns	0,0292 ns	1,5129 ns
Resíduo	112	10,0786	0,000599	0,005596	7,6061	19,8836	349,2499	235,9942	0,4918	2,2073

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 8A – Desdobramento do efeito de monascus dentro de tempo e de sexo para o colesterol total, colesterol-HDL, albumina, creatinina, uréia, ácido úrico e glicose do soro de machos e fêmeas coelhos submetidos a dietas com diferentes doses de rutina e de monascus e avaliados no início do experimento e aos 28 dias

FV	GL	Quadrado Médio							
		Colesterol	Colesterol-HDL	Triacilgliceróis	Albumina	Creatinina	Uréia	Ácido úrico	Glicose
Monascus/ Tempo 0, machos	3	2,4218 ns	58,0020 ns	66,9833 ns	0,0553 ns	0,011712 ns	4,9693 ns	0,002858 ns	57,5819 ns
Monascus/ Tempo 0, fêmeas	3	106,4227 ns	26,7165 ns	47,5333 ns	0,0705 ns	0,044858 ns	5,9872 ns	0,000707 ns	113,3472 ns
Monascus/ Tempo 28, machos	(3)	130,6641 ns	43,4511 ns	6,7492 ns	0,0857 ns	0,069175 ns	8,2273 ns	0,009833 **	102,1065 ns
Linear	1	126,6606 ns	87,2685 ns	8,3732 ns	0,1439 *	0,080727 ns	20,0905 ns	0,000187 ns	26,0573 ns
Quadrático	1	265,2602 ns	0,2642 ns	0,0479 ns	0,0119 ns	0,077939 ns	0,5911 ns	0,000966 ns	144,9882 ns
Desvio	1	0,0715 ns	42,8205 ns	11,8265 ns	0,1012 ns	0,048858 ns	4,0002 ns	0,028346 **	135,2741 ns
Monascus/ Tempo 28, fêmeas	(3)	2.424,4103 **	119,0045 ns	2.355,7966 *	0,0548 ns	0,052619 ns	52,0300 *	0,001293 ns	148,8439 ns
Linear	1	3.017,2810 *	182,5329 ns	3.333,4560 *	0,1018 ns	0,010441 ns	93,6917 *	0,001567 ns	78,4733 ns
Quadrático	1	4.134,2360 **	0,3021 ns	2.966,7210 *	0,0105 ns	0,143188 *	51,8866 ns	0,001136 ns	171,8598 ns
Desvio	1	121,7139 ns	174,1784 ns	767,2129 *	0,0521 ns	0,004227 ns	10,5117 ns	0,001176 ns	196,1986 ns
Resíduo	112	460,7317	48,0726	757,0778	0,0362	0,030200	17,2701	0,001389	66,9859

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 9A – Desdobramento de efeito de monascus dentro tempo e de sexo para gama-GT, bilirrubina direta e total, clorofila, proteína, TGO, TGP, fósforo e cálcio do soro de machos e fêmeas de coelhos submetidos a dietas com diferentes doses de rutina e de monascus e avaliados no início do experimento e aos 28 dias.

FV	GL	Quadrado Médio								
		Gama-GT	Bilirrubina direta	Bilirrubina total	Clorofila	Proteína	TGO	TGP	Fósforo	Cálcio
Monascus/ Tempo 0, machos	3	31,2667 *	0,000080 ns	0,000840 ns	2,3205 ns	14,3540 ns	254,7333 ns	2.086,3170 **	0,0110 ns	1,9393 ns
Monascus/ Tempo 0, fêmeas	3	23,0667 ns	0,000085 ns	0,005500 ns	1,5138 ns	5,6552 ns	536,7336 ns	3.580,8490 **	0,0364 ns	0,9400 ns
Monascus/ Tempo 28, machos	(3)	16,4503 ns	0,000340 ns	0,014152 ns	22,6736 *	1,9367 ns	1.332,7455 *	525,2282 ns	1,5205 *	2,0041 ns
Linear	1	33,5602 ns	0,000003 ns	0,027437 *	11,9203 ns	3,2787 ns	102,6305 ns	404,8791 ns	0,2380 ns	2,8117 ns
Quadrático	1	10,2496 ns	0,000269 ns	0,005067 ns	42,0327 *	2,3556 ns	2.315,7040 *	92,7416 ns	0,4420 ns	2,2669 ns
Desvio	1	5,5411 ns	0,000748 ns	0,009952 ns	14,0677 ns	0,1757 ns	1.579,9020 *	1.078,0640 *	3,8814 **	0,9336 ns
Monascus/ Tempo 28, fêmeas	(3)	33,1355 *	0,000240 ns	0,013322 ns	13,3562 ns	36,4860 ns	1.664,4477 **	156,5617 ns	1,0425 ns	1,5138 ns
Linear	1	49,6305 *	0,000001 ns	0,000195 ns	6,0941 ns	97,1036 *	16,1390 ns	89,2375 ns	0,0352 ns	4,1882 ns
Quadrático	1	3,9383 ns	0,000500 ns	0,006058 ns	0,0001 ns	4,0175 ns	2.869,1690 **	47,4372 ns	1,5961 ns	0,2447 ns
Desvio	1	45,8376 *	0,000219 ns	0,033712 *	33,9745 *	8,3369 ns	2.108,0350 *	333,0104 ns	1,4961 ns	0,1085 ns
Resíduo	112	10,0786	0,000599	0,005596	7,6061	19,8836	349,2499	235,9942	0,4918	2,2073

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.