

## **EFEITOS DE CHITOSAN E NARINGENINA SOBRE LIPÍDEOS NO SORO DE COELHOS COM HIPERLIPIDEMIA INDUZIDA POR TRITON.**

Effects of chitosan and naringenin on lipids serum in hyperlipidemic rabbits induced by Triton

*Lopes<sup>1</sup>, R. M. ; Oliveira<sup>1</sup>, T. T.; Nagem<sup>2</sup>, T. J.; ; Pinto<sup>3</sup>, A. S.; Camini<sup>1</sup>, N. A. Leão<sup>1</sup>, M. A.*

**RESUMO:** Chitosan, uma substância natural derivada da quitina, juntamente com naringenina, uma flavanona, foram testadas em coelhos hiperlipidemicos induzidos por Triton WR 1339. Para tanto elas foram administradas, via intraperitoneal, na dose de 30mg/Kg de peso corporal, vinte horas após a administração do Triton. Decorridos vinte e quatro horas da administração das drogas, foram coletadas amostras de sangue, centrifugadas e dosados colesterol, HDL-colesterol e triacilgliceróis. Os resultados mostraram que chitosan associado à naringenina mostrou maior percentagem de redução para colesterol e triacilgliceróis enquanto que para HDL-colesterol chitosan foi mais efetivo.

**SUMMARY:** Chitosan, a derived natural compound from quitin together with naringenin, a flavanone, were tested in hyperlipidemic rabbits induced by Triton WR 1339. They were administered by intraperitoneal route in the dosis of 30mg/Kg of corporal weight, twenty hours after the administration of Triton. Elapsed twenty-four hours after drug's administration, the blood were analyzed. Results evidence that chitosan + naringenin present the largest percentual of reduction of cholesterol and triacilglicerols while the best results for cholesterol-HDL have been obtained with chitosan.

1- Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

2- Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto, 35400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

3-Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

## INTRODUÇÃO

Triton WR 1339 conhecido como tyloxapol, um detergente não anionico 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).

Dados recentes mostram que mistura de flavonóides kaempferitrina, isoladamente, mostraram ação hipotensiva em sistema cardiovascular de coelhos e ratos com hipertensão induzida. A kaempferitrina na dose de 290  $\mu\text{g/Kg}$  diminuiu a pressão sangüínea em 32% e a freqüência cardíaca em 29% em coelhos, já a mistura de flavonóides diminuiu a pressão em 41% e a freqüência cardíaca em 33% na dose de 20  $\mu\text{g/Kg}$ . A alta atividade da mistura de flavonóides pode ser atribuída à seu efeito sinérgico (Gohar et al., 1997).

Agullo et al., 1997, relatam 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 a nível celular através de seu receptor transmembrana que tem uma atividade de tirosina quinase. Levando-se em conta que a dieta fornecida à coelhos tem em torno de 80% de carboidratos, esta ação torna-se muito importante.

Em coelhos, a fermentação de carboidratos no ceco produz ácidos voláteis, tais como ácido acético, ácido propiônico, que são fontes de energia para o metabolismo dos constituintes do intestino grosso (Cheeke, 1995).

Sfakianos et al., 1997, relatam que genisteína, quando administrada na dieta de ratas ovariectomizadas, um modelo experimental utilizado para estudos de osteoporose pós-menopausa, previne a perda de constituintes do tecido ósseo.

A ação antiinflamatória de flavonóides foi demonstrada por Lee et al., 1982, e Lanni e Backer, 1985, que mostraram os efeitos de diversos flavonóides, dentre eles a naringenina, como inibidores da fosfolipase  $A_2$  na concentração de  $10^{-4}$  M, alterando o metabolismo do ácido araquidônico e inibindo a ciclooxigenase e a lipoxigenase.

Le Houx et al., 1993, relatam que chitosan, um produto natural derivado de quitina (2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glicose), funciona como uma resina trocadora de ânions e pode se ligar a ânions hidrofóbicos de ácidos biliares em um 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  $\beta$ -D-manopiranosila e cadeias laterais simples de  $\alpha$ -D-(1-4) galactopiranosila (Leite, 1993). A capacidade de "goma guar" em reduzir os lipídeos 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, Spiller et al., 1991. A maioria dos estudos em humanos apresenta redução de 10 a 15% em colesterol-LDL nos tratamentos de até três meses (Smith e Holm, 1982, Todo et al., 1990).

Levando-se em conta os diversos mecanismos e efeitos atribuídos aos flavonóides, particularmente aqueles relacionados com os níveis de glicose e de lipídeos, foi proposto o presente trabalho para verificar a influência da naringenina isolada e associada ao chitosan, sobre os níveis de lipídeos em coelhos hiperlipidêmicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho, foram utilizados coelhos albinos, adultos, machos, da raça Nova Zelândia, com peso médio ( $2500 \pm 200$  g), que receberam ração comercial SOCIL, fornecida na proporção de 170g/dia, e água à vontade durante todo o experimento. Estes animais foram provenientes do Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Os animais permaneceram 5 dias para adaptação em gaiolas apropriadas, em área especial, com ventilação adequada. Para a realização do experimento, foram constituídos 5 grupos, contendo cada um 6 animais, que receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 1	Ração
Grupo 2	Ração + Triton
Grupo 3	Ração + Triton + Chitosan
Grupo 4	Ração + Triton + Naringenina
Grupo 5	Ração + Triton + Chitosan + Naringenina

Para a indução da hiperlipidemia, foi administrado Triton WR 1339, via intraperitoneal, na dose de 300 mg/Kg de peso corporal, utilizando como veículo NaCl 0,9%. Após 20 horas da administração do Triton, foram fornecidos aos coelhos, 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 o NaCl 0,9%. Decorridos 24 horas destas administrações, procedeu-se à coleta de amostras de sangue, que foram centrifugadas à 7100 x G por 15 minutos para obtenção do soro. As dosagens sorológicas utilizando-se Kits Laborlab foram feitas para colesterol e triacilglicerois seguindo o método de Henry, 1982, e para colesterol HDL o método de Lima et al, 1985. Para as quantificações utilizou-se espectrofotômetro da marca Hitachi.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios dos lipídeos em soro de coelhos encontram-se registrados nos Quadros I, II e III, expressos em mg/dL, com suas respectivas percentagens de variação.

Quadro 1 – Valores médios de colesterol ( $\pm$ erro-padrão) de soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por Triton, e suas percentagens de variação.

Grupos	Colesterol	%de Variação
1-Ração	39,42 $\pm$ 1,94	
2-Ração + Triton	248,50 $\pm$ 3,56 A	
3-Ração + Triton + Chitosan	117,62 $\pm$ 2,41 Ba	-52,67
4-Ração + Triton + Naringenina	85,47 $\pm$ 2,28 Bb	-65,61
5-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 ( $P < 0,05$ ).

De acordo com os resultados obtidos no Quadro I, pode-se observar que o Triton induziu a hiperlipidemia em coelhos, elevando os níveis de colesterol em cerca de 6,3 vezes (Grupos 1 e 2). Os resultados indicam claramente que em relação aos níveis de colesterol, todos os tratamentos provocaram uma redução significativa, mas chitosan associado à naringenina apresentou a maior percentagem de redução, mostrando um efeito sinérgico entre estes compostos.

Quadro II – Valores médios de colesterol- HDL ( $\pm$ erro-padrão) de soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por Triton e suas respectivas percentagens de variação.

Grupos	Colesterol-HDL	% de Variação
1-Ração	30,60 $\pm$ 1,73	
2-Ração + Triton	98,51 $\pm$ 1,66 A	
3-Ração + Triton + Chitosan	95,49 $\pm$ 2,46 Aa	- 3,07
4-Ração + Triton + Naringenina	68,67 $\pm$ 1,59 Bc	-30,29
5-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 ( $P < 0,05$ ).

Os resultados do Quadro II, mostram que o Triton elevou acima de 3 vezes, os níveis de colesterol-HDL ( Grupos 1 e 2). Sua análise indica que o Grupo 3 ( chitosan) apresentou o melhor nível de colesterol-HDL pelo Teste de Tukey, apesar da redução não ser significativa em relação ao Grupo 2, mas representa valores mais de duas vezes superiores ao Grupo 1. Isto é uma vantagem pois esta lipoproteína é a responsável pelo transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado onde é metabolizado.

Quadro III – Valores médios de triacilgliceróis ( $\pm$ erro-padrão) de soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por Triton, e suas respectivas percentagens de variação.

Grupos	Triacilgliceróis	% de Variação
1-Ração	100,54 $\pm$ 0,92	
2-Ração + Triton	581,96 $\pm$ 9,52 A	
3-Ração + Triton + Chitosan	262,52 $\pm$ 4,26 Ba	-54,89
4-Ração + Triton + Naringenina	206,64 $\pm$ 3,38 Bb	-64,49
5-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 ( $P < 0,05$ ).

Os resultados do Quadro III, mostram que todos os tratamentos foram significativos em relação aos níveis de triacilgliceróis. Dentre eles, destaca-se o chitosan + naringenina que apresentou maior percentagem de redução (71,42%), observando seu efeito de sinérgico .

Trabalhos realizados com catequina, prunina e 5-O-glicosil hesperetina, administrados via intraperitoneal, apresentaram para triacilgliceróis na dose de 20 mg/Kg de peso corporal, redução de 20% para a catequina, prunina e a 5-O-glicosil hesperetina. Na dose de 10 mg/Kg de peso corporal, não houve

efeito para triacilgliceróis, embora para colesterol total tenha ocorrido uma redução significativa (Choi et al., 1991).

Quercetina e Taxifolina administrados via oral (misturados à ração) em ratos também apresentaram efeitos hipolipidêmicos, inclusive com efeito de excreção observado devido ao aumento de colesterol e ácidos biliares nas fezes (Itaya et al., 1992). Já a pulicarina reduziu significativamente os níveis de colesterol de soro sanguíneo (Sagittinoya et al., 1992).

Le Houx et al., 1993, mostraram o efeito de quitosana sobre a redução da atividade enzimática da HMG-CoA redutase em fígado de ratos, como um possível mecanismo de ação destas substâncias e Koehrlé et al., 1986, mostraram que flavonóides inibem a enzima desidrogenase iodotironina que converte  $T_4$  em  $T_3$ , 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  $AMP_C$ . Este por sua vez, ativa a proteína quinase C, que atua sobre a lipase, ativando-a, e desta forma, aumenta a atividade hidrolítica dos triacilgliceróis.

Em conclusão, pode-se afirmar que naringenina, quitosana e sua associação, foram eficazes no controle do metabolismo lipídico. Estes efeitos hipolipidêmicos podem estar associados à inibição, pelo quitosana, da HMG-CoA redutase, com conseqüente redução da biossíntese de colesterol e pela ações dos flavonóides, como a naringenina, que aumenta a excreção de colesterol e ácidos biliares pelas fezes de animais experimentais. O quitosana é também capaz de exercer uma ação seqüestradora de sais biliares ao nível do tubo gastrointestinal, levando, conseqüentemente, à uma redução desses ácidos e de outros lipídeos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-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 c inhibition. *Biochemical pharmacology*. 53: 1649-1657, 1997.

2-Cheeke, P. R. *Alimentacion y nutricion del conejo*. Editora Acribia, S.A. ., pp. 429, 1995.

3-Choi, J. S.; Yokosawa, T.; Oura, H. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*. *J. Natural Products*, 54: 1, 218-224, 1991.

4-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. *Br. J. Nutr.* 68: 217-229, 1992.

5-Gohar, A. A. ; Elmazar, M. A.; Isolation of hypotensive flavonoids from chemopodium species growing in Egypt. *Phytoterapy Research* 11: 564-567, 1997.

6-**Henry, J.B.** - *Diagnósticos clínicos e conduta terapêutica por exames laboratoriais*. 16<sup>a</sup> Ed., I: 226-228, 1982.

7-**Ide, T.; Moriuchi, H.; Nihimoto, K.** Hypolipidemic effect of guar gum and its enzyme hidrolysate in rats fed highly saturated fat diets. *Ann. Nutr. Metab.* 35: 34-44, 1991

8-**Itaya, S.; Igarashi, K.** Effects of Taxifolin on the Serum Cholesterol level in rats. *Biosc. Biotech. Biochem.* 56 :9, 1942-1494, 1992.

9- **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. pp. 359-371, 1986,

10-**Lanni, C.; Becker, E. L.** Inhibition of neutrophil phospholipase A<sub>2</sub> by p-bromphenylacetyl bromide, nordihydroguaiaretic acid 5,8,11,14 eicosatetrayenoic acid and quercetin. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun* 76: 214, 1985.

11-**Lee, T. P.; Matteliano, M. L.; Middleton, J. R. E.**; Effect of quercetin on human polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospholip metabolism. *Life Sci.* 31: 2765- 2768, 1982.

12- **Le Houx, J. G.; Grodin, F.** Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology*, Mar 1432:3, 1078-84, 1993.

13-**Leite, J. I. A.** *Mecanismo de Ação de Goma Guar sobre o metabolismo de colesterol*. Tese MS, UFMG, pp.124, 1993.

14- **Lima, A. O ; Soares, J.B; Greco, J.B; Gallizi, J; & Cançado J.R.** *Métodos de Laboratório Aplicado a Técnicas e Interpretação*. 6<sup>a</sup> Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1985.

15-**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. *J. Nutrition* 84: 201-204, 1964.

16-**Sagittinoya, G. V.; Eshfakoya, K. A.; Olimov, V.** Flavonoid Pulicarpin from *Pulicaria salvifolia* and its hypolipidemic activity. *Chemical of Natural compounds*. 128: 286-288, 1992.

17-**Sfakianos, J.; Coward, L.; Kirk, M.; Barnes, S.** Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *American Society for Nutritional Sciences*, 1260-1268, 1997.

18-**Sharma, R. D.** Effect of various isoflavones on lipid levels in triton treated rats. *Atherosclerosis*, 33 : 371-375, 1979.

19-**Siddiqui, M. T.; Siddiqui, M.** Hypolipidemic principles of *Cicer arietinum*: Biochanin A and Formonetin. *Lipids*, 11: 3, 1975, 1996.

20-**Smith, U.; Holm, G.** Effect of a modified guar gum preparation of glucose and lipid levels in diabetics and health volunteers. *Atherosclerosis*, 45: 1-10, 1982.

21-**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 hypercholesterolemics adults. *Atherosclerosis and Thrombosis*, 11: 1204-1208,1991.

22-**Todd, P. A.; Benfield, P.; Goa, K. L.** Guar gum: a review of its pharmacological properties and use as a dietary adjunct in hypercholesterolaemia. *Drugs* 39: 917-926,1990.

23-**Tuomilehto, J.; Silvasti, M.; Manninem, V.; Uusitupa, M.; Aro, A.** Guar gum and gemfibrozil na effective combination in the treatment of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 76: 71-77,1989.

24-**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*, 81: 145-150,1996.

**Ouro Preto, 21 de março de 2000**

À

Editoria da Revista Brasileira de Análises Clínicas  
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas  
Rua Vicente Licínio, 95 - Tijuca  
20270-340  
Rio de Janeiro

Prezados Senhores,

Tenho a satisfação de submeter à apreciação desta conceituada Revista o artigo “Efeitos de Chitosan e Naringenina sobre lipídeos no soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por Triton” , para fins de publicação. Sem mais para o momento apresento-lhe, minhas,

Cordiais Saudações,

Professor Tanus Jorge Nagem  
Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas  
Da Universidade Federal de Ouro Preto  
Campus Morro do Cruzeiro  
35400-000- Ouro Preto Minas Gerais