

Efeito de flavonóides e de corantes do urucum sobre a hiperlipidemia induzida em coelhos*

Flavonoids and natural urucum dyes on induced hyperlipidemic rabbits

Leonardo Ramos Paes de Lima¹, Tânia Toledo de Oliveira², Tanus Jorge Nagem³ & Sergio Pacheco⁴

RESUMO - Induziu-se hipercolesterolemia em coelhos da raça Nova Zelândia e compararam-se os efeitos hipolipidêmicos, por via oral, dos flavonóides baicaleína, morina, naringenina, naringina, quercetina, rutina, crisina, luteolina e apigenina, os corantes naturais extraídos do urucum norbixina e bixina e o medicamento comercial hipolipidêmico colestiramina. Todos os flavonóides estudados e o corante bixina foram significativamente mais hipocolesterolêmicos que o medicamento colestiramina, sendo que as melhores reduções foram observadas com naringenina (54,04%), naringina (49,26%), quercetina (49,78%), rutina (48,89%), crisina (55,56%), luteolina (52,58%) e apigenina (49,88). As substâncias que mais aumentaram o HDL foram os flavonóides baicaleína (122,21%), apigenina (281,63%), morina (10,79%) e luteolina (21,14%) e o medicamento colestiramina (37,26%). A maior parte dos flavonóides estudados reduziu mais o triacilglicerol do que o medicamento colestiramina, sendo a baicaleína (-56,91% do que o controle sadio) e a rutina os mais eficientes. Verificou-se também, *in vitro*, que bixina, norbixina, apigenina e luteolina aumentaram a atividade da lipase. Tais resultados indicam que os compostos estudados poderiam ser utilizados como medicamento se devidamente testados no homem. Os cortes histológicos do arco aórtico e da artéria aorta não mostraram diferenças entre os grupos tratados e os controles, enquanto que algumas diferenças histológicas foram observadas nos hepatócitos dos grupos tratados em relação aos coelhos hiperlipidêmicos.

PALAVRAS-CHAVE - flavonóides, bixina, norbixina, colestiramina, colesterol, HDL-colesterol.

SUMMARY - The effects of some flavonoids (quercetin, rutin, morin, naringin, naringenin, baicalein, cricin, luteolin and apigenin) and the natural urucum dyes bixin and norbixin, besides the commercial drug colestiramin were tested on lipid metabolism of hiperlipidemic New Zealand rabbits. All flavonoids and bixin significantly decreased serum cholesterol levels, being more efficient than colestiramin. Baicalein, apigenin, morin, luteolin and colestiramin were the most efficient drugs in increasing HDL-cholesterol levels. Most of the flavonoids studied were more efficient in decreasing triacylglycerols than colestiramin. By using *in vitro* assays, it was possible to show that bixin, norbixin, apigenin and luteolin increased lipase activity, thus providing a possible explanation to their action on *in vivo* lipid metabolism. Histological studies did not show any differences concerning aortic structures, although they did show some differences between treated and hyperlipidemic hepatocytes.

KEYWORDS - flavonoids, bixin, norbixin, colestiramin, cholesterol, HDL-cholesterol.

INTRODUÇÃO

Alimentação de coelhos, suplementada com colesterol, produz severas lesões ateroscleróticas vasculares, hipercolesterolemia e um aumento no estresse oxidativo de vários tecidos (3;7;8;21;28). Entretanto, alguns trabalhos sugerem que esses efeitos podem ser neutralizados ou atenuados com o uso de flavonóides e também de corantes extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.).

Flavonóides são grupos de compostos naturais que ocorrem nos vegetais e possuem em sua estrutura três anéis aromáticos, constituindo unidades de um esqueleto de carbono C₆-C₃-C₆. Há alimentos ricos em flavonóides, como soja, maçã, uva, cebola, repolho, brócolis, chicória, aipo, chá e vinho tinto. Os flavonóides inibem as enzimas da rota do ácido araquidônico, o que lhes confere propriedades anti-inflamatórias e anti-aterogênicas (10). Inibem também a oxidação de LDL sendo, portanto, cardioprotetores (14;22). Demonstrou-se que dietas ricas em flavonóides podem reduzir os danos miocárdiais pós-isquêmicos em ratos (9). O efeito vasodilatador do endotélio foi descrito para alguns tipos de flavonóides. A diocleína, um flavonóide isolado da leguminosa *Dioclea grandiflora*, foi investigada em aorta de ratos, apresentando efeito vaso relaxante sobre o endotélio e indução de formação de óxido nítrico, com elevação de GMP cíclico. Tal conjunto de efeitos pode resultar na inibição do processo de trombose (17).

Um estudo com ratos hiperlipidêmicos, utilizando os flavonóides baicaleína, morina, naringenina, naringina, quercetina e rutina, mostrou que estes compostos reduzem consideravelmente a quantidade de colesterol sanguíneo (12).

A naringina foi avaliada como anticancerígeno potente (1) e agente hipolipidêmico (26), exibindo também atividade antioxidativa (16) e nenhuma atividade mutagênica (11). Alguns autores mostraram ainda os efeitos da naringina no LDL-colesterol, pela inibição da HMG-CoA redutase em ratos hipercolesterolêmicos (25;26).

KIM *et al.* (13) mostraram que a naringina reduz as concentrações de colesterol plasmático pela inibição da atividade da HMG-CoA redutase hepática, pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes hepáticas contra stress oxidativo e pelo aumento da excreção fecal de esteróis em modelos animais hipercolesterolêmicos.

O urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) é cultivado em quase todos os estados brasileiros. A partir das suas sementes obtêm-se vários tipos de corantes, diferentes entre si na solubilidade e pigmentação. As indústrias de corantes os exportam ou comercializam no mercado interno para as indústrias alimentícias (principalmente laticínios, salsicharias, massas, etc.), cosméticas e farmacêuticas.

A bixina é o pigmento natural da semente de urucum, representando 80% de todos os carotenóides presentes. A partir dele, são obtidos os demais pigmentos, como a norbixina (lipossolúvel), o sal da norbixina (hidrossolúvel) e

Recebido em 13/08/2008

Aprovado em 26/11/2009

¹Doutorando do Departamento de Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais

²Professor Associado I, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

³Professor Titular, Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

⁴Prof. Titular Voluntário, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

*Trabalho realizado no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa.

produtos de degradação térmica, que têm como características a lipossolubilidade e uma coloração amarela mais estável, ideal para o uso em massa.

LUDUVING (20) relata que, após testes com cães, ratos e coelhos, comprovou-se a eficiência da água do urucum, obtida por maceração das sementes (composto por mais de 80% de bixina como pigmento), na redução significativa dos índices de colesterol e triacilglicerol, possivelmente acelerando o metabolismo das gorduras, sem agir sobre o HDL colesterol.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a ação de alguns flavonóides e corantes do urucum no tratamento da hiperlipidemia em coelhos, além de fornecer algumas indicações sobre seus possíveis mecanismos de ação *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

COMPARAÇÃO ENTRE OS EFEITOS DA APLICAÇÃO DE 10 MG DE FLAVONÓIDES E CORANTES NO METABOLISMO LIPÍDICO DE COELHOS HIPERLIPIDÊMICOS

Para a comparação dos efeitos de alguns flavonóides e corantes sobre o metabolismo lipídico, foram utilizados coelhos albinos, machos, da raça Nova Zelândia, com peso médio 2.264 ± 120 g e idade média de 56 dias, acondicionados em gaiolas individuais, com temperatura controlada ($26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os animais receberam a ração comercial e água *ad libitum*. Os coelhos foram distribuídos ao acaso em 14 grupos experimentais, contendo seis animais cada, que receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 1 – Ração (controle normal)

Grupo 2 – Ração + Colesterol (1%) + Ácido cólico (0,1%) (controle hiperlipidêmico)

Grupo 3 – idem grupo 2+ baicaleína (10 mg)

Grupo 4 – idem grupo 2 + morina (10 mg)

Grupo 5 – idem grupo 2 + naringenina (10 mg)

Grupo 6 – idem grupo 2 + naringina (10 mg)

Grupo 7 – idem grupo 2 + quercetina (10 mg)

Grupo 8 – idem grupo 2 + rutina (10 mg)

Grupo 9 – idem grupo 2 + crisina (10 mg)

Grupo 10 – idem grupo 2 + luteolina (10 mg)

Grupo 11 – idem grupo 2 + apigenina (10 mg)

Grupo 12 – idem grupo 2 + norbixina (10 mg)

Grupo 13 – idem grupo 2 + bixina (10 mg)

Grupo 14 – idem grupo 2 + colestiramina (10 mg)

Para induzir a hiperlipidemia, foi administrado diariamente, juntamente com a ração, 1% de colesterol + 0,1% de ácido cólico em relação ao peso da ração diária, num período de 30 dias.

As doses de medicamentos foram fornecidas em cápsulas, diariamente, por via oral, durante 30 dias.

No trigésimo dia foram coletadas amostras de sangue pelo plexo venoso retro orbital, utilizando-se tubo capilar, com os animais sob jejum de doze horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $7100 \times g$, durante 15 minutos, para a obtenção do soro. As dosagens sorológicas foram efetuadas no equipamento de dosagens multiparamétrico Bioquímica (Alizé), utilizando-se os "kits" Biolab. Os resultados foram expressos em mg/dL de colesterol, colesterol-HDL e triacilgliceróis.

EFEITO DE MODIFICADORES QUÍMICOS SOBRE A ATIVIDADE DA LIPASE

Os flavonóides luteolina e apigenina e os corantes bixina e norbixina foram testados em presença de lipase.

A atividade enzimática foi determinada *in vitro* através do método de CHERRY (6), utilizando-se o "kit" enzimático da Biobrás, em presença de éster de glicerol (balbi 6,7 g/L; lauril sulfato de sódio 5,8 g/L) como substrato a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, em tampão tris-HCl 12,1 g/L, pH 8,55; azida sódica 0,5 g/L. As velocidades iniciais foram determinadas pela liberação de um cromóforo visível a 412 nm. Os estudos do efeito dos modificadores químicos foram realizados em presença e ausência dos compostos citados, variando-se a concentração destes modificadores para concentrações fixas do substrato. A ação enzimática foi acompanhada pela medida da absorvância a 412 nm.

Foi feita uma solução estoque de concentração 5×10^{-3} mol/L das substâncias a serem analisadas, sendo que a luteolina, a apigenina e a bixina foram solubilizadas com propileno glicol, enquanto a norbixina foi solubilizada com água destilada.

O estudo cinético foi realizado com o branco, o controle e os modificadores. A ordem de entrada dos reagentes na reação de cor foi criteriosamente seguida, de acordo com o esquema da tabela 1.

Após homogeneização e incubação por 2 minutos em banho-maria a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, adicionou-se o substrato apenas aos tubos controle e modificadores. Seguiu-se nova homogeneização e incubação por exatamente 30 minutos, a uma temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, 1000 μL de lauril sulfato de sódio a 8 g/L foram adicionados a todos os tubos, para interromper a reação. As leituras fotométricas foram realizadas a 412 nm, aferindo-se o aparelho com o branco.

Este experimento foi realizado com cada amostra, em três repetições. Assim, não foi possível proceder à análise de variância dos dados de atividade enzimática, procedendo-se, ao invés, ao estudo da dispersão dos mesmos.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após o término dos experimentos, foram coletadas amostras de fígado e arco aórtico dos animais, numa repetição de quatro amostras para os grupos naringina, rutina e baicaleína, escolhidos ao acaso, a fim de proceder à análise histopatológica, para se verificar se houve o acúmulo de gordura hepática e alterações nas camadas da íntima do arco aórtico.

Para a confecção das lâminas, os fragmentos foram coletados e desidratados em álcoois de 70 à 95%, passando após por álcool absoluto por três vezes e, a seguir, por uma mistura de álcool + xilol e por xilol três vezes. O tempo de permanência em cada solução alcoólica foi de 30 minutos para os álcoois 70 a 95%, 1 hora para cada banho de álcool absoluto, 30 minutos para a mistura de álcool + xilol e 50 minutos para cada banho de xilol. Após desidratação, os fragmentos foram imersos em parafina duas vezes, por 1 h, e depois novamente em parafina, por aproximadamente 12h. Os cortes foram realizados com micrótomo rotativo manual (American Optical Company), com espessura de 5 μm , e colocados nas lâminas. Procedeu-se à desparafinização e hidratação com xilol (2 banhos de 10 minutos), álcool absoluto 95%, 80% e 70% (3 minutos em cada) e água (5 minutos). As lâminas foram coradas com hematoxilina durante um minuto e eosina durante 30 segundos. O excesso de corante foi removido em água corrente. Após montagem e secagem, as lâminas foram analisadas ao microscópio Olympus BX 40, qualitativamente, de acordo com a quantidade de gotículas de gordura depositadas nos tecidos, comparando-se os grupos tratados com medicamentos entre si e com os grupos controle.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizou-se experimentos casualizados e os dados foram submetidos ao teste de Tukey para comparação entre as médias dos grupos que receberam medicamento ($P > 0,05$), teste de Dunnett para comparação de cada grupo com os grupos controles ($P < 0,05$) e teste F para comparação entre os grupos controles ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

COMPARAÇÃO ENTRE OS EFEITOS DA APLICAÇÃO DE 10 MG DE FLAVONÓIDES E CORANTES NO METABOLISMO LIPÍDICO DE COELHOS HIPERLIPIDÊMICOS

Efeitos sobre os níveis de colesterol total

De acordo com a tabela 2, houve um aumento de 722,77% de colesterol do grupo hipercolesterolêmico em relação ao grupo controle normal, sendo este valor estatisticamente significativo pelo teste F. Todos os grupos tratados mostraram níveis significativamente elevados de colesterol em relação ao grupo normal pelo teste de Dunnett.

Entretanto, todos os tratamentos reduziram significativamente as concentrações de colesterol em relação ao grupo controle hipercolesterolêmico pelo teste de Dunnett. As melhores reduções foram observadas nos tratamentos que receberam as substâncias naringenina, 54,04%, naringina, 49,26%, quercetina, 49,78%, rutina, 48,89%, crisina, 55,56%, luteolina, 52,58% e apigenina, 49,88%.

Todos os flavonóides estudados e o corante bixina reduziram significativamente as concentrações de colesterol a valores inferiores ao do medicamento colestiramina, pelo teste de Tukey.

Os flavonóides promovem uma redução no colesterol sanguíneo através de uma redução na atividade da HMGCoA-redutase, acarretando um incremento na degradação e no consumo do colesterol e uma inibição na colesterologênese (2). Alguns estudos citam ainda a propriedade dos flavonóides de promoverem um decréscimo na atividade da hidroximetilglutaril-CoA redutase e do esterol o-aciltransferase, duas enzimas chaves para o metabolismo do colesterol (15). De acordo com BEST & JENKINS (4), a ênfase futura para a correção de anormalidades lipídicas, com decréscimo de desordens cardiovasculares, serão preferencialmente focadas na redução do LDL-colesterol, por meio de substâncias naturais, como os flavonóides e seus derivados.

O mecanismo de ação dos flavonóides na redução do LDL-colesterol foi postulado por WILCOX *et al.* (29). Segundo estes autores, os flavonóides promovem um decréscimo na secreção de apo B devido a uma redução da atividade e expressão da enzima acil-CoA colesterol acil transferase. Adicionalmente, os flavonóides reduziram a atividade e a expressão da proteína de transferência de triacilgliceróis microsomais, promovendo um aumento na expressão dos receptores para LDL, o que resulta em um acréscimo na recaptação e degradação do LDL-colesterol. Tais eventos proporcionam uma redução na biodisponibilidade de lipídeos que contém a proteína apo B em sua estrutura.

Efeitos sobre os níveis de HDL-colesterol

O grupo controle hipercolesterolêmico apresentou níveis significativamente elevados de HDL-colesterol em relação ao grupo controle normal, de 486,81%, de acordo com a tabela 3. Tais resultados refletem o aumento já relatado nas concentrações de colesterol total, acompanhado de suas frações lipídicas.

Das drogas testadas, a apigenina, a baicaleína, o medicamento colestiramina, a luteolina e a morina aumentaram os

níveis de HDL-colesterol acima dos níveis dos controles hiper-HDL de 281,63%, 122,21%, 37,26%, 21,14% e 10,79%, respectivamente, sendo os efeitos dos dois primeiros e da colestiramina estatisticamente significativos pelo teste de Dunnett.

Os flavonóides naringina e naringenina e os corantes naturais bixina e norbixina tiveram efeitos hipo-HDL não significativos, sendo que os níveis de redução em comparação com o grupo controle hiper-HDL foram de 5,67%, 16,84%, 15,22% e 11,43%, respectivamente. Já os efeitos hipo-HDL apresentados pelos flavonóides quercetina (-58,44%), crisina (-57,49%) e rutina (-22,72%) foram mais acentuados e estatisticamente significativos em relação ao grupo controle hiper-HDL pelo teste de Dunnett.

O efeito hipo-HDL destes compostos evidencia seus efeitos nas reduções das taxas de colesterol total. Tais compostos, ao reduzirem as concentrações de colesterol total sanguíneo, reduzem também, conseqüentemente, os níveis de HDL-colesterol.

Estudos epidemiológicos estabeleceram que uma baixa concentração de HDL-colesterol no plasma sanguíneo é um fator de risco independente para desordens coronárias. Uma baixa concentração nas taxas de HDL é uma anormalidade lipídica comum em pacientes com desordens coronárias. O "Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Trial" apresentou fortes evidências em favor de que uma alta concentração de HDL-colesterol poderia reduzir o risco de desordens coronárias e a mortalidade em pacientes com anormalidades lipídicas (5).

Efeitos sobre os níveis de triglicérides

O grupo controle hipertrigliceridêmico apresentou níveis estatisticamente elevados de triacilgliceróis quando comparado ao grupo controle normal (tabela 4). Os grupos tratados com baicaleína, quercetina, crisina, naringenina e rutina obtiveram uma redução significativa na concentração de triacilglicerol quando comparados com o grupo hipertrigliceridêmico, pelo teste de Dunnett, sendo estes valores de -84,85%, -77,51%, -59,93%, -24,26%, e -19,48%, respectivamente.

Os melhores efeitos observados na redução dos triacilgliceróis plasmáticos foram conseguidos pelos flavonóides baicaleína, quercetina e crisina. A baicaleína e a quercetina diminuíram os níveis de triacilglicerol a valores inferiores ao do grupo controle normal, sendo que os valores conseguidos pela baicaleína (-56,91%) foram estatisticamente significativos em relação a este controle pelo teste de Dunnett.

Cerca de metade dos flavonóides estudados tiveram um melhor efeito hipotrigliceridêmico do que o medicamento colestiramina e não produziram efeitos tóxicos aparentes nas concentrações estudadas.

Diversos experimentos com a utilização de flavonóides têm mostrado um efeito hipotrigliceridêmico. Uma das possíveis explicações para este fato seria a de causarem um aumento na atividade da lipase. Esta enzima hidrolisa os triacilgliceróis, ocasionando uma maior mobilização dos ácidos graxos sanguíneos para o fígado, tecido muscular e adiposo (19).

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Não se observaram diferenças marcantes na análise histopatológica entre os grupos tratados com os flavonóides naringina, rutina e baicaleína em relação ao grupo hiperlipidêmico, ou seja, todos os grupos que receberam flavonóides também apresentaram vacúolos, de forma acentuada, nos hepatócitos. Porém, os vacúolos do grupo controle apresentaram uma distribuição centro lobular, enquanto

que os grupos tratados apresentaram uma distribuição centro lobular e em direção à periferia do lóbulo (Figura 1). Os cortes da artéria aorta dos animais não apresentaram nenhuma alteração histológica, quando comparados com o grupo sadio. Os cortes da parede do arco aórtico dos animais tratados não apresentaram alterações histológicas quando comparados com o grupo sadio (figura 1).

EFEITO DE MODIFICADORES QUÍMICOS SOBRE A ATIVIDADE DE LIPASE

Após análise da dispersão dos dados, não foi possível ajustar equações de regressão, tendo como variável dependente a atividade enzimática e independente a concentração do modificador.

Os resultados obtidos na determinação da atividade de lipase em presença dos corantes (bixina e norbixina) extraídos do urucum e dos flavonóides (apigenina e luteolina) são apresentados na tabela 5 e na figura 2.

De acordo com a tabela 5 e a figura 2, observou-se que o melhor resultado apresentado pela apigenina foi obtido com uma concentração de $5,4 \times 10^{-5}$ mol/L, sendo esta atividade de 39,36 UI, o que proporciona um aumento de 43,13% em relação ao controle.

A melhor ativação para a bixina foi de 67,40 UI, na concentração de $5,4 \times 10^{-5}$ mol/L, obtendo-se uma porcentagem de ativação de 145% em relação ao experimento controle.

Já para a luteolina, a concentração na qual o melhor resultado foi obtido foi a de $4,8 \times 10^{-5}$ mol/L, sendo esta ativação de 67,37 UI, ou seja, um aumento de 145% em relação ao controle.

A norbixina, por sua vez, apresentou uma atividade de 47,05 UI, na concentração de $5,4 \times 10^{-5}$ mol/L, o que proporciona uma ativação de 71% em comparação com o controle.

Notou-se que, em todos os gráficos, a variação na atividade da lipase permanece praticamente inalterada em concentrações abaixo de $4,8 \times 10^{-5}$ mol/L. A partir desta concentração, a atividade começa a aumentar, atingindo o ápice em torno de $5,4 \times 10^{-5}$ mol/L, com exceção da luteolina. A seguir, ocorre um decréscimo de atividade com o aumento da concentração.

Os melhores resultados, indubitavelmente, foram os da bixina e da luteolina, que alcançaram um aumento de 145% na atividade da lipase em relação aos testes feitos sem a adição dos modificadores. Isto poderia ser explicado pelo fato das estruturas químicas da bixina e norbixina serem muito semelhantes às dos ácidos graxos (que são substrato da lipase) que, portanto, poderiam ocupar regiões do centro ativo da enzima, modificando sua conformação e otimizando a catálise.

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

Flavonóides podem estar apenas associados à molécula da enzima, modificando sua conformação. Eles podem interagir em regiões hidrofóbicas da enzima e, portanto, serem aí estabilizados por pontes de hidrogênio.

Estes resultados mostram que os flavonóides e corantes testados modificam a atividade da lipase, uma enzima que, no organismo, degrada os triacilgliceróis, liberando ácido graxo e glicerol. Para explicar este mecanismo de ação, sugeriu-se que poderia haver a formação de quelatos entre a enzima e esses compostos. Esses quelatos induziriam a mudança conformacional da enzima, modificando seu centro ativo (23). LIMA *et al.* (19) observaram uma estreita correlação entre a redução dos níveis de triacilgliceróis no soro e fígado de ratos hiperlipidêmicos e a ativação da

enzima lipase pelos flavonóides, mostrando uma inter-relação entre o aumento da atividade da lipase e maior hidrólise dos triacilgliceróis.

TABELA I
Esquema da ordem de entrada dos reagentes no meio reacional.

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

* A solução de lipase foi preparada dissolvendo-se 1 mg de lipase pancreática em 10 mL da solução tampão.

Depois de misturados, retirou-se 1 mL desta solução e diluiu-se para 100ml com o tampão.

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

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

TABELA II
Valores médios do colesterol total no soro sanguíneo de coelhos, avaliados aos 30 dias, e seus respectivos percentuais de variação.

Tratamentos (grupos)	Colesterol (mg/d ± erro-padrão) L)	% de variação em relação ao grupo:	
		controle	hipercoleste rolêmico
1 - controle normal	115,47 ± 15,07	-	
2 - controle hiperlipidêmico	950,05 ± 382,43	+722,77 #	
3 - baicaleína	518,54 ± 58,04 b	+349,07 *	-45,42 *
4 - morina	551,98 ± 14,72 b	+378,03 *	-41,90 *
5 - naringenina	436,64 ± 35,93 c	+278,14 *	-54,04 *
6 - naringina	482,05 ± 59,84 c	+317,47 *	-49,26 *
7 - quercetina	494,22 ± 44,95 c	+328,01 *	-47,98 *
8 - rutina	485,57 ± 50,98 c	+320,52 *	-48,89 *
9 - crisina	422,20 ± 78,86 c	+265,64 *	-55,56 *
10 - luteolina	450,42 ± 41,29 c	+290,07 *	-52,59 *
11 - apigenina	476,16 ± 21,67 c	+312,37 *	-49,88 *
12 - norbixina	709,21 ± 195,54 a	+514,20 *	-25,35 *
13 - bixina	531,74 ± 144,83 b	+460,50 *	-44,03 *
14 - colestiramina	760,99 ± 320,47 a	+559,04 *	-19,90 *

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

* Teste de Dunnett (P<0,05). # Teste F (P<0,05)

TABELA III
Valores médios do colesterol-HDL no soro sanguíneo de coelhos, avaliados aos 30 dias, e seus respectivos percentuais de variação.

Tratamentos	Colesterol-HDL (mg/dL ± erro-padrão)	% de variação em relação aos grupos:	
		normal	Hiper-HDL
1 - controle normal	30,75 ± 11,74		
2 - controle hiper-HDL	180,44 ± 60,70	+486,81#	
3 - baicaleína	400,96 ± 13,34 b	+1203,92 *	+122,21 *
4 - morina	199,91 ± 55,79 d	+550,11 *	+10,79
5 - naringenina	170,21 ± 45,67 e	+453,52 *	-5,67
6 - naringina	150,05 ± 8,64 e	+387,98 *	-16,84
7 - quercetina	74,99 ± 49,45 g	+143,87 *	-58,44 *
8 - rutina	139,44 ± 37,88 f	+353,48 *	-22,72 *
9 - crisina	76,70 ± 3,96 g	+149,45 *	-57,49 *
10 - luteolina	218,58 ± 13,80 cd	+610,85 *	+21,14
11 - apigenina	688,61 ± 1,82 a	+2139,39 *	+281,63 *
12 - norbixina	152,98 ± 21,84 e	+397,49 *	-15,22
13 - bixina	159,82 ± 8,71 e	+419,73 *	-11,43
14 - colestiramina	247,67 ± 57,45 c	+705,44 *	+37,26 *

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

* Teste de Dunnett (P<0,05). # Teste F (P<0,05)

TABELA IV
Valores médios do triacilglicerol no soro sanguíneo de coelhos, avaliados aos 30 dias e seus respectivos percentuais de variação.

Tratamentos	Triacilglicerol (mg/dL ± erro-padrão)	% de variação em relação ao grupo:	
		normal	hipertriglicéridêmico
1 – controle normal	64,70 ± 12,68		
2 – controle hipertriglicérido	184,01 ± 0,69	+184,40 #	
3 – baicaleína	27,88 ± 22,11 f	-56,91 *	-84,85 *
4 – morina	172,05 ± 6,50 b	+165,92 *	-6,50
5 – naringenina	138,82 ± 4,56 d	+114,55 *	-24,56 *
6 – naringina	176,91 ± 27,37 b	+173,43 *	-3,86
7 – quercetina	41,38 ± 2,65 e	-36,04	-77,51 *
8 – rutina	148,16 ± 5,56 c	+129,00 *	-19,48 *
9 – crisina	73,73 ± 15,64 e	+13,96	-59,93 *
10 – luteolina	187,51 ± 51,83 a	+189,81 *	+1,90
11 – apigenina	194,33 ± 10,93 a	+200,36 *	+5,61
12 – norbixina	201,67 ± 25,22 a	+211,71 *	+9,60
13 – bixina	157,84 ± 29,21 c	+143,96 *	-14,22
14 – colestiramina	152,21 ± 35,66 c	+135,26 *	-17,28

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).
* Teste de Dunnett (P<0,05). # Teste F (P<0,05)

TABELA V
Atividade de lipase em presença dos modificadores apigenina, bixina, luteolina e norbixina.

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

Média ± erro-padrão.

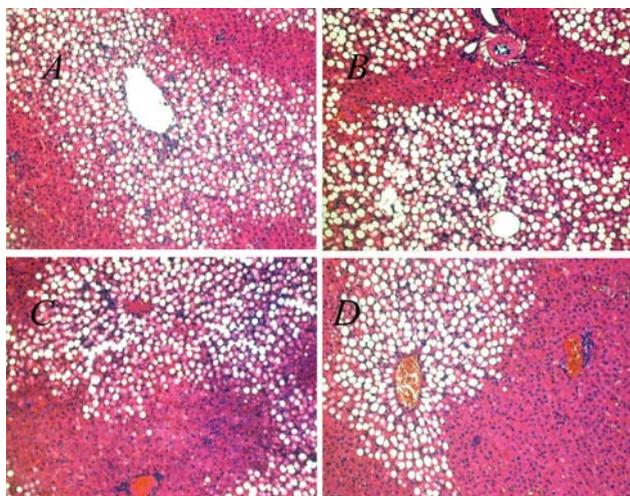


Figura 1 – Histologia do fígado de coelhos após trinta dias de experimentação. A, grupo 2 (ração, colesterol e ácido cólico). B, grupo 6 (naringina). C, grupo 8 (rutina). D, grupo 3 (baicaleína). (70X). HE.

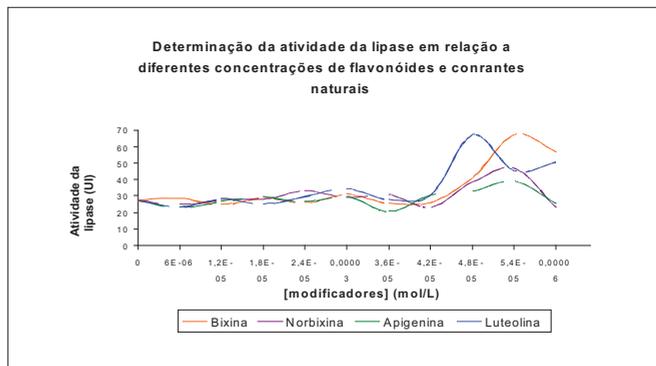


Figura 2 - Determinação da atividade da lipase na presença de várias concentrações de modificadores.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram uma eficaz ação dos flavonóides e corantes naturais sob o metabolismo lipídico de coelhos e sua ação ativadora sobre a lipase *in vitro*. Em trabalho prospectivo anterior (18), observamos que os coelhos, *Oryctolagus cuniculus*, da variedade Nova Zelândia, respondem rapidamente a uma dieta contendo 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol do peso médio da ração consumido diariamente, tornando-se hiperlipidêmicos. No presente estudo, optou-se então por utilizar coelhos da raça Nova Zelândia na determinação dos efeitos farmacológicos de alguns flavonóides e corantes naturais, que são utilizados atualmente como agentes hipolipidêmicos.

Foram comparados os efeitos dos flavonóides baicaleína, morina, naringenina, naringina, quercetina, rutina, crisina, luteolina e apigenina, os corantes naturais extraídos do urucum norbixina e bixina e o medicamento comercial hipolipidêmico colestiramina na dosagem de 10 mg/kg de peso corporal, por via oral.

Todas as substâncias reduziram as concentrações de colesterol no soro sanguíneo dos coelhos. As melhores reduções foram observadas com as substâncias naringenina, 54,04%, naringina, 49,26%, quercetina, 49,78%, rutina, 48,89%, crisina, 55,56%, luteolina, 52,58% e apigenina, 49,88.

Todos os flavonóides estudados e o corante bixina reduziram as concentrações de colesterol a valores inferiores ao do medicamento colestiramina e suas médias foram estatisticamente significantes em relação à média deste medicamento, pelo teste de Tukey. Isto é um resultado promissor, dado que a colestiramina vêm sendo substituída por apresentar vários efeitos colaterais.

Os melhores efeitos observados na redução do triacilglicerol plasmático foram conseguidos pelos flavonóides baicaleína, quercetina e crisina. A baicaleína e a crisina diminuíram os níveis de triacilglicerol a valores inferiores ao do grupo controle normal, sendo que os valores conseguidos pela baicaleína (-56,91%) diferiram significativamente dos desse grupo pelo teste de Dunnett. Cerca da metade dos flavonóides estudados reduziu mais o triacilglicerol do que o medicamento colestiramina.

As substâncias que promoveram aumento no nível de colesterol-HDL, em relação ao grupo já hiper-HDL, foram os flavonóides baicaleína, apigenina, morina e luteolina e o medicamento colestiramina (122,21%, 281,63%, 10,79%, 21,14% e 37,26%, respectivamente). Por outro lado, as significativamente hipo-HDL foram quercetina, crisina e rutina (58%, 57% e 22%, respectivamente).

O fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo

de triacilgliceróis e colesterol, assim como pela síntese de lipoproteínas. Um desequilíbrio permanente entre o influxo de ácidos graxos e a utilização e secreção de VLDL gera um acúmulo de triacilgliceróis e ésteres de colesterol nos hepatócitos, que pode levar à esteatose hepática (27). Isto ocorreu também no presente estudo e não foi revertido pela adição dos compostos medicamentosos. Portanto, os fatores envolvidos no desenvolvimento da esteatose deverão ser mais bem investigados.

De uma maneira geral, foi possível observar que as substâncias estudadas apresentaram uma ação farmacológica bastante acentuada no metabolismo lipídico de coelhos hiperlipidêmicos, sem, contudo, causar efeitos tóxicos aparentes. No ensaio *in vitro*, procurou-se caracterizar o efeito dos flavonóides luteolina e apigenina e dos corantes bixina e norbixina sobre a atividade da lipase, variando-se as concentrações das substâncias em estudo.

Todos os compostos testados apresentaram ação ativadora sobre a lipase nas concentrações de 4,8 a 5,4 x 10⁻⁵ mol/L, sendo os melhores resultados apresentados pela bixina e luteolina.

O aumento da atividade da lipase por essas substâncias poderia explicar, em parte, os níveis reduzidos de triacilgliceróis encontrados nos ensaios biológicos. Entretanto, não se podem comparar as concentrações utilizadas no ensaio *in vitro* com as utilizadas *in vivo*, uma vez que a forma de expressar as concentrações é diferente e que as concentrações ideais em ambos os experimentos podem diferir acentuadamente.

Este trabalho demonstrou os efeitos benéficos de alguns flavonóides e corantes naturais sob o metabolismo lipídico de coelhos. Porém, novas pesquisas devem ser realizadas para que estes compostos possam ser utilizados como medicamentos humanos, principalmente quanto à bioquímica e a toxicologia destas substâncias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da FAPEMIG e da Rede de Toxicologia e Farmacologia da FAPEMIG.

REFERÊNCIAS

- 1 - ABOOBAKER, V.S.; BALGI, A.D.; BHATTACHARYA, R.K - In vivo effect of dietary factors on the molecular action of aflatoxin B1: Role of non-nutrient phenolic compounds on the catalytic activity of liver fraction. *In Vivo* 8: 673-84, 1994.
- 2 - ANILA, L.; VIJAYALAKSHMI, N.R. - Flavonoids from *Emblica officinalis* and *Mangifera indica*-effectiveness for dyslipidemia. *J. Ethnopharmacol.* 79(1): 81-7, 2002.
- 3 - BALKAN, J.; KANBAGH, O.; HATIPOGLU, A.; KÜÇÜK, M.; ÇEVİKBAS, U.; AYKAÇ-TOKER, G.; UYSAL, M. - Improving effect of dietary taurine supplementation on the oxidative stress and lipid levels in the plasma, liver and aorta of rabbits fed on a high-cholesterol diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:1755-1758, 2002.
- 4 - BEST, J.D.; JENKINS, A.J. - Novel agents for managing dyslipidaemia. *Expert Opin. Inv. Drugs* 10(11):1901-11, 2001.
- 5 - BROUSSEAU, M.E.; SCHAEFER, E.J. - New developments in the prevention of atherosclerosis in patients with low-density lipoprotein cholesterol. *Curr. Atheros. Repr.* 3(5): 365-72, 2001.
- 6 - CHERRY, J.S. - *Am. J. Physiol.* 100: 266, 1932.
- 7 - DE LA CRUZ, J.P.; QUINTERO, L.; VILLALOBOS, M.A.; DE LA CUESTA, F.S. - Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipemic rabbits: influence of olive oil administration. *Biochim. Biophys. Acta* 1485: 36-44, 2000.
- 8 - DEL BOCCIO G.; LAPENNA D.; PORRECA, E.; PENNELI, A.; SAVINI, F.; FELICIANI, P.; RICCI, G.; CUCCURULLO, F. - Aortic antioxidant defense mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 81: 127-35, 1990.
- 9 - FACINO, R.M.; CARINI, M.; ALDINI, G.; BERTI, F.; ROSSONI, G.; BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. - Diet enriched with procyanidins enhances antioxidant activity and reduces myocardial post-ischaemic damage in rats. *Life Sci.* 64: 627-642, 1999.
- 10 - FERRANDIZ, M.L.; ALCARAZ, M.J. - Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agent Actions* 32: 283-288, 1991.
- 11 - FISHER, K.D. - Evaluation of the health aspects of hesperidin, naringin, and citrus flavonoid extract as food ingredients. Washington, Bureau of Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Contract No FDA. 223-78-2100. 1982.
- 12 - GOMES, S.M. - Efeitos de flavonóides sobre o metabolismo lipídico. 1998, 129 pag.. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- 13 - KIM, H.J.; OH, G.T.; PARK, Y.B.; LEE, M.K.; SEO, H.J.; CHOI, M.S. Naringenin alters the cholesterol biosynthesis and antioxidant enzyme activities in LDL receptor-knockout mice under cholesterol fed condition. *Life Sci.* 74:1621-34, 2004.
- 14 - KONDO, K.; HIRANO, R.; MATSUMOTO, A.; IGARASHI, O.; ITAKURA, H. - Inhibition of LDL oxidation by cocoa. *Lancet* 348:1514-1518, 1996.
- 15 - KUROWSKA, E.M.; SPENCE, J.D.; JORDAN, J.; WETMORE, S.; FREEMAN, D.J.; PICHÉ, L.A.; SERRATONE, P. - HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 72(5):1095-100, 2000.
- 16 - LAMBEV, I.; KRUSHKOV, I.; ZHELIAZKOV, D.; NIKOLOV, N. - Antiexudative effect of naringenin in experimental pulmonary edema and peritonitis. *Ekspperimentalna Meditsina i Morfologija* 19: 207-212, 1980.
- 17 - LEMOS, V.S.; FREITAS, M.R.; MULLER, B.; LINO, Y.D.; QUEIROGA, C.E.G.; CÔRTEZ, S.F. - Diocleins, a new nitric oxide and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. *Eur. J. Pharmacol.* 386: 41-46, 1999.
- 18 - LIMA, L.R.P. - Estudos comparativos de modelos animais submetidos a disfunções lipídicas (hiperlipidemia) pela ação de compostos naturais (flavonóides e corantes). 2004, 144 pag. Dissertação (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- 19 - LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; OLIVEIRA, M.G.A.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; GOMES, S.M.; FILHO, J.T.S. - Determinação da atividade de lipase na presença de Morina, Naringenina, Naringina e Rutina. *Ciência Agrotécnica de Lavras* 23(3): 626-631, 1999.
- 20 - LUDUVING, M.M. - Conheça os inimigos do colesterol. Saúde! É vital! São Paulo Azul p. 169, 1997.
- 21 - MAHLFOUZ, M.M.; KUMMEROW, F.A. - Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J. Nutr. Biochem.* 11: 293-302, 2000.
- 22 - MAZUR, A.; BAYLE, D.; LAB, C.; ROCK, E.; RAYSSIGUIER, Y. - Inhibitory effect of procyanidin-rich extracts on LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 145: 421-422, 1999.
- 23 - MOULIN, A.; TEISSERE, M.; BERNARD, C.; PIERONI, G. - Lipases of the Euphorbiaceae family: purification of a lipase from *Euphorbia characias*. latex and structure function relationships with the B chain of ricin. *Proc. Nat. Acad. of Sci.* 91: 24, 1994.
- 24 - SHIN, Y.W.; BOK, S.H.; JEONG, T.S.; BAE, K.H.; JEOUNG, N.H.; CHOI, M.S.; LEE S.H.; PARK, Y.B. - Hypocholesterolemic effect of naringin associated with hepatic cholesterol regulating enzyme changes in rats. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 69(5): 341-347, 1999.
- 25 - SO, F.V.; GUTHRIE, N.; CHAMBERS, A.F.; MOUSSA, M.; CARROL, K.K. - Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr. and Cancer* 26:167-181, 1996.
- 26 - STUDENIK, P. - Lipid disorders in liver diseases. *Vnitř. Lek.* 46:547-8, 2000.
- 27 - YAMAKOSHI, J.; KATAOKA, S.; KOGA, T.; ARIGA, T. - Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*142:139-149, 1999.
- 28 - WILCOX, L.J.; BORRADALE, N.M.; DE DREU, L.E.; HUFF, M.W. - Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. *J. Lipid Res.* 42(5): 725-43, 2001.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Profª. Drª Tânia Toledo de Oliveira
Laboratório de Biofármacos, Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular, Vila Gianetti nº 26, Universidade Federal de Viçosa
CEP 36570-000. Viçosa, MG.
E-mail: ttoledo@ufv.br