

Efeito de diferentes doses de rutina sobre as concentrações de albumina, creatinina, uréia e ácido úrico no soro de coelhos

Effect of different rutin dosis on the concentration of albumin, creatinine, urea and uric acid in the serum of rabbits

Renato M. Lopes¹; Tânia T. Oliveira¹; Tanus J. Nagem²; Leonardo R.P. Lima¹; Maria A. Leão¹ & Ednaldo Q. Lima¹

RESUMO – O flavonóide rutina tem atividade hipocolesterolêmica e poderá no futuro transformar-se em um fármaco importante para o tratamento das dislipidemias. Para isto, torna-se necessário à avaliação dos efeitos tóxicos desta substância principalmente sobre o fígado e o rim. O objetivo do presente trabalho foi determinar o efeito de diferentes doses (20, 40 e 60mg) do flavonóide rutina sobre as concentrações séricas de albumina, creatinina, uréia e ácido úrico em coelhos machos e fêmeas da raça Nova Zelândia, com 55 dias de vida. Após 28 dias de tratamento, não foram evidenciados efeitos hepato ou nefrotóxicos em nenhuma das doses de rutina utilizadas.

PALAVRAS-CHAVE – Rutina, albumina, creatinina, uréia, ácido úrico

SUMMARY – The flavonoid rutin has hypocholesterolemic activity and could be use in the future as an important drug for the dyslipidemic treatment. It becomes necessary to evaluate the toxicology of this substance, mainly in the liver and the kidney. The aim of the present work was to evaluate the effect of three different rutin dosis (20, 40 and 60mg) on the concentration of albumin, creatinine, urea and uric acid in the serum of rabbits New Zeland race male and female with 55 days of life. Our results showed no toxicixity effects after 28 days of treatment and no significantly statistic on the concentration of the biochemical parameters before and after the treatment with these three different dosis tested.

KEYWORDS – Rutin, albumin, creatinine, uric acid, urea, rabbits.

INTRODUÇÃO

Este estudo é uma avaliação preliminar das propriedades tóxicas do flavonóide rutina com o intuito de se obter informações acerca dos possíveis riscos de seu emprego para a saúde. De modo ideal a dose média deve produzir efeitos intermediários e um mínimo de efeitos colaterais (Brito, 1994).

Flavonóides são substâncias naturais, pertencentes à classe dos compostos aromáticos chamados polifenóis, encontradas nos alimentos, principalmente em verduras, leguminosas, frutas, grãos, sementes, ervas e também em bebidas como vinho e chá (Gohar e Elmazar, 1997; Mello e Silva, 1989).

Diversos ensaios "in vivo" e "in vitro" vêm comprovando e determinando a ampla variedade das atividades biológicas dos compostos flavonoídicos. Segundo Ratty e Das (1988), algumas dessas atividades já haviam sido observadas anteriormente. Destacam-se, dentre outras, os seguintes efeitos dos flavonóides sobre os sistemas biológicos: capacidade antioxidativa (constitui-se na atividade mais estudada nos trabalhos até agora desenvolvidos), atividades antiinflamatórias (Emim, 1994); atividade contra o desenvolvimento de tumores (Kandaswami et col., 1992), antihepatotóxica

(Middleton & Kandaswami, 1992), antiulcerogênica (Izzo E. col, 1994); antiplaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais. Segundo Anton E. Beretz, 1990), as propriedades farmacológicas dos flavonóides ainda não foram totalmente elucidadas.

Após uma década de avanços, pode-se afirmar que novos estudos toxicológicos e farmacológicos devam ser realizados, uma vez que a ampla diversidade estrutural desses compostos, bem como a interação entre eles possibilita novos efeitos.

Dados da literatura mostram que a mistura de flavonóides apresenta ação hipotensiva em sistema cardiovascular de coelhos e ratos com hipertensão induzida. O flavonóide kaempferitrina na dose de 290mg/Kg em coelhos, diminuiu a pressão sanguínea em 32% e a frequência cardíaca em 29%, já a mistura de flavonóides na dose de 20mg/Kg diminuiu a pressão em 41% e a frequência cardíaca em 33%. A alta atividade da mistura pode ser atribuída a seu efeito sinérgico (Gohar e col., 1997).

Nem todas as atividades biológicas atribuídas aos flavonóides têm o seu mecanismo de ação completamente esclarecido. Todavia, os trabalhos relatados na literatura demonstram outras propriedades de grande importância para a área clínica e médica: capacidade

Recebido em 14/01/2005

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa Av. P.H. Rolfs s/n, 56571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

²Departamento de Química, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Morro do Cruzeiro, 35400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

antiulcerogênica, aumento da permeabilidade microvascular e diminuição da taxa de glicose no soro sanguíneo (Izzo e col., 1994); Lanni & Becker, 1985).

As pesquisas com flavonóides têm avançado cada vez mais e outras atividades biológicas têm sido pesquisadas. Catequinas tem apresentado atividades sobre enzimas proteolíticas. Em câncer humano e em animais enzimas proteolíticas invadem células e produzem metástase. Uma destas enzimas é a uroquinase. A inibição da uroquinase causa decréscimo de tumores e pode levar a completa remissão do câncer. Um dos compostos a epigallocatequina 3-galato age ligando-se a uroquinase e bloqueando histidina em posição 57 e serina em 195 que são os seus sítios catalíticos (Jankun e col., 1997). Um segundo estudo realizado com este mesmo flavonóide mostra que 150mg deste é capaz de suprimir a angiogênese, um processo chave no crescimento dos vasos sanguíneos que é requerido para o crescimento de tumores e metástase (Cao e Cao, 1999).

Modelos com animais experimentais para desordens tais como dislipidemias e aterosclerose são utilizados e animais com doenças induzidas ou modificados geneticamente (tais como coelhos, camundongos, porquinhos da Índia, cães, suínos e macacos) têm sido utilizados. Em particular, diferenças e similaridades têm sido obtidas nos parâmetros bioquímicos do sangue, fisiologia e patologia. No entanto todos os estudos com modelos animais têm limitações (Moghadasina e col., 2001). Para que um novo medicamento seja utilizado estes estudos tornam-se necessários.

Assim, o presente trabalho foi elaborado com o objetivo de verificar o efeito de diferentes doses do flavonóide rutina sobre ganho de peso e as concentrações de proteínas, creatinina e ácido úrico no soro de coelhos, machos e fêmeas da raça New Zeland com 55 dias de idade. Este estudo é importante uma vez que a rutina é um fármaco em potencial para o tratamento das dislipidemias e deve-se preliminarmente avaliar os efeitos nefro e hepatotóxicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados coelhos da raça New Zeland provenientes do setor de cunicultura da Universidade Federal de Viçosa com 55 dias de idade no início do experimento. Os animais foram divididos em, machos e fêmeas, constituindo-se 4 grupos por sexo, contendo cada um 5 animais, que receberam rutina nas doses de 20, 40 e 60mg, além dos grupos controles que receberam apenas ração. Os animais foram colocados em gaiolas individuais, com temperatura ambiente de $22 \pm 3^\circ\text{C}$, sendo que a taxa de umidade relativa do ar foi mantida em torno de 70%. O regime alimentar constituiu-se de água potável *ad libitum* e ração comercial "Socil", sendo fornecida uma quantidade de 120g/dia por animal. Após um período de adaptação de 7 dias, os

animais receberam, diariamente, durante 28 dias, uma cápsula contendo rutina com suas respectivas doses. Foram estipulados dois tempos para a coleta de sangue e pesagem dos animais, sendo o tempo 0 (zero) aquele após o período de adaptação e tempo final após os 28 dias. Foram coletadas amostras de sangue pelo plexo venoso retro-orbital, sendo, a seguir, centrifugadas a $3500 \times g$ durante 15 minutos e efetuadas as dosagens, no soro, de proteínas totais, creatinina e ácido úrico em equipamento de dosagens multiparamétrico de Bioquímica (Alizé) da Biomérieux, utilizando-se os kits da mesma empresa.

As análises estatísticas realizadas foram teste F ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Os resultados de variações de pesos, concentrações de uréia, creatinina, ácido úrico e albumina obtidos estão apresentados nas Tabelas I, II e III nos tempos 0 (zero) e após 28 dias de tratamento com rutina nas doses de 20, 40 e 60mg na ração.

As diferentes doses de rutina administradas aos coelhos não ocasionaram variação do peso destes animais ($P > 0,05$). Pelos resultados obtidos todos os grupos não foram estatisticamente significativos.

Em relação à creatinina, os resultados obtidos indicam que rutina, nas doses empregadas ao longo do

TABELA I
Variação do peso dos coelhos (média \pm desvio-padrão), machos e fêmeas antes e após 28 dias de tratamento com o flavonóide rutina nas doses de 20, 40 e 60mg

Grupos	Tempo (Dias)	Ganho de peso (g)	
		Machos	Fêmeas
Ração n = 5	0 28	660,00 \pm 2,30 A	670,00 \pm 2,45 A
Ração + 20mg de rutina n = 5	0 28	683,00 \pm 2,40 A	670,00 \pm 2,45 A
Ração + 40mg de rutina n = 5	0 28	683,00 \pm 2,40 A	642,00 \pm 2,45 A
Ração + 60mg de rutina n = 5	0 28	634,00 \pm 2,35 A	632,00 \pm 2,60 A

Em cada característica, cada grupo e cada tempo (linha) não difere estatisticamente entre si pelo teste F ($P < 0,05$). n = nº de animais

TABELA II
Concentrações de creatinina e uréia no soro de coelhos, machos e fêmeas antes e após 28 dias de tratamentos com o flavonóide rutina nas doses de 20, 40 e 60mg

Grupos	Tempo (Dias)	Creatinina (mg/dL)		Uréia (mg/dL)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Ração n = 5	0 28	1,18 \pm 0,20Ab 1,53 \pm 0,22Aa	1,24 \pm 0,23Aa 1,30 \pm 0,12 Ba	27,52 \pm 1,12Aa 27,96 \pm 2, 12Ba	28,54 \pm 2,30Ab 36,58 \pm 2,32Aa
Ração + 20mg de rutina n = 5	0 28	1,23 \pm 0,23Aa 1,28 \pm 0,24 Aa	1,18 \pm 0,20 Aa 1,37 \pm 0,12Aa	28,20 \pm 2,20 Aa 29,10 \pm 2,21Aa	28,60 \pm 2,23Aa 29,04 \pm 2,30Aa
Ração + 40mg de rutina n = 5	0 28	1,20 \pm 0,12 Aa 1,14 \pm 0,13Ba	1,29 \pm 0,12Aa 1,37 \pm 0,13Aa	28,62 \pm 2,22Aa 26,32 \pm 2,23 Ba	29,48 \pm 2,45Aa 33,86 \pm 2,50Aa
Ração + 60mg de rutina n = 5	0 28	1,17 \pm 0,16Aa 1,29 \pm 0,16Aa	1,31 \pm 0,13Aa 1,30 \pm 0,13Aa	30,12 \pm 2,23Aa 30,04 \pm 3,34 Aa	28,40 \pm 2,78Aa 29,30 \pm 2,89Aa

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

Em cada característica, cada grupo e cada sexo (coluna), a difere de b pelo teste de F ($P < 0,05$). n = nº de animais

TABELA III
Concentrações de albumina e ácido úrico no soro de coelhos, machos e fêmeas antes e após 28 dias de tratamentos com o flavonóide rutina nas doses de 20, 40 e 60mg

Grupos	Tempo (Dias)	Albumina (mg/dL)		Ácido úrico (mg/dL)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Ração n=5	0	4,65 ± 0,20 Aa	4,33 0,23 ± Ba	0,14 ± 0,01Aa	0,14 ± 0,01Aa
	28	4,73 ± 0,21Aa	4,50 ± 0,23Aa	0,13 ± 0,01Aa	0,15 ± 0,01Aa
Ração + 20mg de rutina n=5	0	4,61 ± 0,22Aa	4,68 ± 0,25Aa	0,15 ± 0,01Aa	0,15 ± 0,01Aa
	28	4,67 ± 0,23Aa	4,47 ± 0,23Aa	0,12 ± 0,01Aa	0,11 ± 0,01Aa
Ração + 40mg de rutina n=5	0	4,60 ± 0,23Aa	4,56 ± 0,23Aa	0,14 ± 0,10Aa	0,14 ± 0,01Aa
	28	4,52 ± 0,23Aa	4,33 ± 0,23Aa	0,15 ± 0,01Aa	0,13 ± 0,01Aa
Ração + 60mg de rutina n=5	0	4,49 ± 0,20Aa	4,50 ± 0,23Aa	0,14 ± 0,01Aa	0,14 ± 0,01Aa
	28	4,68 ± 0,24Aa	4,33 ± 0,23Ba	0,13 ± 0,01Aa	0,14 ± 0,01Aa

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

tratamento, não promoveram efeitos nefrotóxicos em coelhos, machos e fêmeas quando mensurados as concentrações de creatinina embora tenham ocorrido pequenas variações.

O grupo-controle de coelhos, machos tratados com a rutina apresentaram a maior média (1,53mg/dL) aos 28 dias recebendo apenas ração.

Os coelhos, machos e fêmeas apresentaram diferenças de concentrações séricas de creatinina estatisticamente significativas nos grupos-controle e ração + rutina 40mg aos 28 dias. Considerando-se os valores normais de creatinina para machos de 1,18mg/dL e para fêmeas de 1,24mg/dL no início do experimento, às variações com os diversos tratamentos foram relativamente baixas para alterações fisiológicas nos animais. Ao se comparar os grupos machos e fêmeas tratados com rutina apenas o grupo 40mg deste flavonóide foi estatisticamente significativo.

Já em relação à uréia, apenas fêmeas tratadas com ração apresentaram variações nas concentrações de uréia estatisticamente significativas, quando comparamos os tempos inicial e final do experimento aumentando de 28,54 para 36,58mg/dL. (Tabela II).

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 40mg de rutina, machos apresentaram concentrações séricas de uréia (26,32mg/dL) inferiores aos das fêmeas (33,86mg/dL).

Observa-se que os valores normais de uréia nos coelhos antes do início do experimento e que receberam ração (grupo controle) foram de 27,52mg/dL para machos e 28,54mg/dL em fêmeas. (Tabela II).

Para a albumina, a Tabela III mostra que machos apresentaram valores maiores que as fêmeas, para os valores de albumina no grupo-controle, no início do ensaio, e no grupo ração + 60mg de rutina ao final dos tratamentos. No entanto estas variações dentro do mesmo sexo foram normais. As variações neste parâmetro não foram consideradas tóxicas.

Para o ácido úrico, a Tabela III mostra que os valores médios de ácido úrico não foram estatisticamente significativos. O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas nos mamíferos. Após 28 dias de tratamento com rutina todos os grupos em estudo (ma-

chos e fêmeas), mantiveram constantes as médias de ácido úrico no soro sanguíneo dos animais (0,13mg/dL).

DISCUSSÃO

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.

A creatinina é o anidrido da creatina que se forma do ácido fosfórico da fosfocreatina muscular, obtida a partir de reações dos aminoácidos arginina e glicina, sendo, portanto, um produto endógeno do catabolismo da creatina. É eliminada pelos rins em quantidade constantes, através da filtração glomerular. Seus valores independem da ingestão de proteínas da alimentação e não é afetada pelo volume urinário (Lima, 1985). As suas concentrações podem aumentar também em insuficiências renais ou severas injúrias musculares (Ragan, 1989).

O fígado é o principal órgão de produção da albumina, que é uma molécula responsável pelo transporte no sangue de medicamentos, nutrientes, e outros constituintes químicos. Coelhos adultos apresentam concentrações de albumina em torno de 0,5g/L. Bortolotti *et al*, 1989. A hiperalbuminemia ocorre na desidratação. A redução das concentrações plasmáticas, 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).

Estudos desenvolvidos em nosso laboratório mostram que flavonóides e corantes naturais têm efeito hipolipidêmico em coelhos (Virtuoso e col., 2001). Pesquisas demonstram ainda que flavonóides como a rutina, quercetina, catequina tem capacidade antioxidante devido à interação de flavonóides com proteínas. Estes estudos mostram que a capacidade antioxidante do plasma é reduzida quando ocorre desproteinização. A adição de quercetina e rutina aumenta a capacidade antioxidante do plasma. A albumina proteína mais abundante do plasma tem potente capacidade antioxidante e também ocorrem ligação desta proteína com flavonóides aumentando este efeito. Assim alterações nos níveis de albumina no sangue afetam inclusive a peroxidação de lipídeos (Artis e col., 2001).

Esses resultados são importantes, pois, sendo a síntese protéica elevada no fígado, se este órgão fosse afetado por estas substâncias, as concentrações séricas de proteína iriam reduzir consideravelmente. Essa redução da síntese ocorre na insuficiência hepática, cirrose, hepatites, neoplasias e síndrome nefrótica no qual ocorrem perdas maciças de albumina através dos

rins e diminuição da capacidade de síntese (Lima, 1985).

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 a função renal. No entanto os coelhos utilizam a uréia para a síntese de proteínas.

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 à redução da eliminação renal, aumento do catabolismo de proteínas ou combinação desses dois processos (Lima, 1985).

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).

Desta forma, de acordo com os resultados apresentados os compostos testados não apresentaram efeito toxicológico nas doses administradas.

Muitas das pesquisas realizadas com produtos naturais demonstram que as atividades antioxidante de flavonóides podem proteger o rim e o fígado de animais da peroxidação lipídica bem como da hemólise de eritrócitos (NG et al, 2000).

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a substância rutina nas doses de 20, 40, 60mg após 28 dias de tratamento não causaram alterações consideradas prejudiciais ao fígado e rim traduzidos pelas pequenas variações de concentrações de albumina, creatinina, uréia e ácido úrico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelas bolsas de produtividade de pesquisas e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Anton, R., Beretz, A. Flavonoids: antithrombotic agents or nutrients Bull. Acad. Natle. Méd., v.174, n.6, p.709-714, 1990.
2. Artis, M. J. T. J., haenen, G. R. M. M., Voss, H. P., Bast, V. A. Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food and Chemical Toxicology*, 39, p.787-791, 2001.
3. Brito, A. S. (1994) Manual de ensaios toxicológicos in vivo. Campinas: Unicamp, 122p.
4. Bortolotti, A., Castelli, D., Bonatti, M.. Hematology and chemistry values of adult, pregnant and newborn New Zeland White rabbits. (*Oryctolagus cuniculus*). *Lab. Anim. Sci.* 39, p. 437-439, 1989.
5. Cao, Y.; Cao, R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature*, 398, p. 381, 1999.
6. Ernim, J. A. D. S., Oliveira, A. B., Iapa, A. J. Pharmacological evaluation of the anti inflammatory citotoxicity of a citrus bioflavonoid. Hesperidin and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46, p. 118-122, 1994.
7. Gohar, A. A., Elmazar, M. M. A. Isolation of hypotensive flavonoids from chenopodium species growing in egypt. *Phytotherapy Research*, v.11, p.564-567, 1997.
8. Izzo, A. A., Di Carlo, G., Mascolo, N., Capasso, F. Antiulcer effect of flavonoids. Role of endogenous PAF. *Phytotherapy Research*, v.8, p.179-181, 1994.
9. Jankun, J., selman, S. H., swieroz, R., Jankun, E. S. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* 387, p.561, 1997.
10. Kanderswami, C., Perkins, E., Drzwiecki, G., sol9oniuk, D. S. Middleton, E. JR. Differential inhibition of proliferation of human squamous cell carcinoma, gliosarcoma and embryonic fibroblast-like cells in culture by plant flavonoids. *Anti-Cancer Drugs*, v.3, p.525-530, 1992.
11. Lima, A. O., J. B. Soares, J. B. Greco. (1985) *Métodos de Laboratórios Aplicados à Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 382 p.
12. Lanni, C., Becker, E. L., Inhibition of neutrophil phospholipase A2 by p-bromphenylacetyl bromide, nordihydroguaiaretic acid, 5,8,11,14 eicosatetraenoic acid and quercetin. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, de coelhos. 2ª ed. Editora Globo, 1989, 214p.
13. Middleton E.; Kandaswami C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory function. *Biochemical Pharmacology*, v. 43, p. 1167-79, 1992.
14. Moghadasina, M.H., Frohlich, J. J., Mcamanus, B. M. Advances in Experimetal dyslipidemia and atherosclerosis. *Lab. Invest.* V.81, n.9, p. 1173-1183, 2001.
15. Ng, T. B.; Liu, F.; Wang, Z. T. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sciences*, v. 66, n. 8, p. 709-723, 2000.
16. Ragan, H. A. (1989). Markers of renal function and injury. In "The clinical Chemistry of Laboratory Animals" (W. E. Loeb and F. W. Quimby, eds.) pp. 321-344, Pergamon, New York.
17. Ratty, A.K., D. A. S., P. N. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, n.39, p.69-79, 1988.
18. Virtuoso, L. S., Oliveira, T. T., Nagem, T. J., Pinto, A. S., Tinoco, A. L. A. T., PINTO, J. G. F. Efeitos de rutina, colestiramina e betalaína no controle de lipídeos em soro de coelhos hiperlipidêmicos. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 33, n.2, p.85-89, 2001.

Endereço para correspondência
Professor Tanus Jorge Nagem
Tel.: (0xx31) 3559-1719
e mail: tjnagem.bh@terra.com.br