

**NAIR LUFT**

**Efeitos dos Flavonóides Naringina e Rutina no  
Metabolismo Lipídico em Cobaias e Aves**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de "*Magister Scientiae*".

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2003

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**NAIR LUFT**

**Efeitos dos Flavonóides Naringina e Rutina no  
Metabolismo Lipídico em Cobaias e Aves**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de "*Magister Scientiae*".

APROVADA: 29 de julho de 2003.

---

Prof. Tanus Jorge Nagem  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup>. Neuza Maria Brunoro Costa  
(Conselheira)

---

Prof<sup>a</sup>. Josefina Bressan Resende Monteiro

---

Prof. Cláudio César Fonseca

---

Prof<sup>a</sup>. Tânia Toledo de Oliveira  
(Orientadora)

Dedico esta tese ao meu pai (*in memoriam*), que foi para mim um exemplo de lealdade, coragem e determinação.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença, força e coragem constantes em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e aos Departamentos de Nutrição e Saúde, Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade da realização deste trabalho.

À professora Tânia Toledo de Oliveira, pela orientação, compreensão, amizade, atenção e ensinamentos oferecidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Neuza Maria Brunoro Costa, pelos ensinamentos e aconselhamentos, pelo carinho, pela amizade e atenção.

Ao professor Tanus Jorge Nagem pela atenção, compreensão e agilização para o bom desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Cláudio César Fonseca, pelo auxílio, dedicação e ensinamentos oferecidos durante a realização da análise histopatológica.

Ao professor Paulo Cecon, pelo auxílio durante a realização das análises estatísticas.

Ao professor Adelson Araújo Tinoco pelos aconselhamentos, e atenção dispensada.

À Maria Aparecida Leão, pela dedicação e ajuda oferecida na realização deste trabalho.

Ao José Geraldo Pinto pela dedicação e pelo apoio indispensável.

Ao Leonardo Ramos Paes de Lima, pelo apoio, pela amizade e grande atenção dispensada.

Aos funcionários do aviário, especialmente, Mauro Jarbas de Souza Godoe, Adriano, Elísio e José Lino pela ajuda e atenção dispensada.

À Solange Starling Brandão pelo carinho e atenção oferecidos.

As amigas Taís, Yaska e Danielle, pelo carinho e apoio, pela compreensão e amizade a mim conferidos.

Ao Fabrício Valente pela dedicação e valorosa ajuda oferecida durante o desenvolvimento dos experimentos.

Aos colegas do laboratório Ednaldo, Fabiana, Cristiane, Aloísio, Iraci e aos estagiários do laboratório pela ajuda e dedicação para o bom desenvolvimento deste trabalho.

A minha mãe, pela vida, pelo carinho e apoio.

As minhas irmãs, meus irmãos e toda família pelo incentivo, apoio, carinho e força constante para superação dos obstáculos.

Aos colegas Nilcemar, Martha, Wilson, Liz e Ingrid, pelo carinho, pela atenção, amizade e auxílio oferecidos.

Aos amigos Cleonice e Volmar Hoppen, Ivo e Lúcia Vizzoto, Haidi Haacke, Elaine Santiago, Cristiana Bueno e Neida da Luz de Jesus, pelo carinho e apoio, pela amizade e compreensão, prestados durante os desafios deste trabalho.

A Universidade de Cruz Alta pelo incentivo e apoio prestado.

A todos, que de alguma forma me ajudaram na conquista de mais uma etapa em minha vida.

## **BIOGRAFIA**

Nair Luft, filha de Ernesto Wilibaldo e Verena Luft, nascida em Humaitá, Rio Grande do Sul em 06 de janeiro de 1968.

Iniciou sua graduação em Nutrição em março de 1987 na Universidade de Ijuí, Rio Grande do Sul, concluindo-a em dezembro de 1990.

Iniciou sua especialização em Nutrição Clínica em janeiro de 1992, na Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Rio Grande do Sul, concluindo-a em julho de 1993.

Em agosto de 2001 iniciou a Pós-graduação em Ciência da Nutrição em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa de tese em 29 de julho de 2003.

## ÍNDICE

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	3

### **ARTIGO 1 – LIPOPROTEÍNAS, FLAVONÓIDES E DOENÇAS CARDIOVASCULARES**

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUÇÃO.....	7
A Descoberta das Lipoproteínas.....	8
Metabolismo das Lipoproteínas.....	9
Transporte de Gordura Exógena .....	11
Transporte de Gordura Endógena.....	11
Transporte Reverso do Colesterol.....	12
Aterosclerose.....	12
Flavonóides.....	15
Propriedades dos Flavonóides.....	16
CONCLUSÕES.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

### **ARTIGO 2 – EFEITOS DOS FLAVONÓIDES NARINGINA E RUTINA NO METABOLISMO LIPÍDICO EM COBAIAS (*Cavia porcellus*)**

RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	28
1 – INTRODUÇÃO.....	29
2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1 – Ensaio Biológico.....	31



2.2 – Substâncias Utilizadas.....	32
2.3 – Dosagens Sangüíneas.....	32
2.3.1 – Determinação de Colesterol Total, Glicose e Triacilglicerol.....	33
2.3.2 – Determinação do colesterol HDL.....	33
2.3.3 – Estimativa do Colesterol VLDL.....	33
2.3.4 – Estimativa do Colesterol LDL.....	34
2.4 – Análise Histopatológica do Fígado e Aorta.....	34
2.4.1 – Confecção das Lâminas.....	34
2.5 – Análise Estatística .....	35
3 - RESULTADOS.....	36
3.1 – Dosagens Sangüíneas, Ganho de Peso, Ingestão Alimentar e Coeficiente de eficiência alimentar.....	36
3.2 – Análises Histopatológicas.....	43
4 – DISCUSSÃO.....	45
5 – CONCLUSÕES.....	50
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

**ARTIGO 3 – EFEITOS DOS FLAVONÓIDES NARINGINA E RUTINA NO METABOLISMO LIPÍDICO EM GALINHAS POEDEIRAS (*Lohmann branca*)**

RESUMO.....	56
ABSTRACT.....	57
1 - INTRODUÇÃO.....	58
2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1 – Ensaio Biológico.....	60
2.2 – Substâncias Utilizadas.....	61
2.3 – Dosagens Sangüíneas.....	61
2.3.1 – Determinação do Colesterol Total e Triacilglicerol.....	61
2.3.2 – Determinação do Colesterol HDL.....	61
2.3.3 – Estimativa do Colesterol não-HDL.....	62
2.4 – Análise Histopatológica do Fígado e Aorta.....	62

2.4.1 – Confecção das Lâminas.....	62
2.5 – Análise Estatística.....	63
3 – RESULTADOS.....	64
.3.1 – Dosagens Sangüíneas e Peso.....	64
3.2 – Análises Histopatológicas.....	68
4 – DISCUSSÃO.....	72
5 – CONCLUSÕES.....	76
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
APÊNDICE.....	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84

## RESUMO

LUFT, Nair, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2003. **Efeitos dos flavonóides naringina e rutina no metabolismo lipídico em cobaias e aves.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Conselheiros: Adelson Luis Araújo Tinoco, Neuza Maria Brunoro Costa e Tanus Jorge Nagem.

O crescente aumento na prevalência das doenças cardiovasculares tem sido considerado um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. A aterosclerose é a patologia básica desencadeante dessas doenças. Numerosos estudos têm mostrado uma variedade de atividades biológicas dos flavonóides como antioxidantes, hipolipemiantes, antiinflamatórias, antibacterianas, anticancerígenas entre outras. A relação inversa entre o consumo de flavonóides da dieta e as doenças cardiovasculares pode estar associada a sua capacidade em reduzir as concentrações plasmáticas de colesterol e inibir a oxidação da LDL, evitando assim, o acúmulo de células espumosas nas artérias e formação de lesões ateroscleróticas. Tendo em vista estes aspectos, os efeitos hipolipemiantes dos flavonóides naringina e rutina foram avaliados isoladamente e de forma associada em cobaias e galinhas poedeiras, além da histopatologia dos tecidos hepáticos e arteriais. As substâncias foram testadas em três grupos experimentais foram fornecidas 30mg de naringina ou 30mg de rutina ou 15mg de naringina + 15mg de rutina em uma dose diária por meio de cápsulas, durante um período de seis semanas, nas duas espécies. Em cobaias, a hiperlipemia foi induzida com 0,4% de colesterol + 0,1% de ácido cólico, enquanto que em galinhas a indução foi realizada com 1% de colesterol. As dosagens sanguíneas em cobaias foram efetuadas após 42 dias de tratamento, em galinhas elas foram efetuadas em 3 tempos: no início do experimento, após 21 e 42 dias de tratamento. De acordo com os resultados obtidos no estudo realizado com cobaias, conclui-se que o tratamento com naringina (38,36%; 50,56%) demonstrou uma redução superior à rutina (30,56%; 42,22%) ou a associação naringina + rutina (33,37%; 41,88%) para as concentrações de colesterol total e colesterol-LDL, respectivamente. Porém, naringina (15,15%) e naringina + rutina (14,30%) mostraram uma leve redução nos níveis de colesterol-HDL. No estudo realizado com galinhas poedeiras, após 21 dias de tratamento a naringina (43,63%) apresentou

uma eficiência maior na redução das concentrações de colesterol total e colesterol-não-HDL, e aos 42 dias rutina (48,10%) demonstrou uma redução superior para estes dois parâmetros. Além disso, após 42 dias de tratamento observou-se redução nas concentrações de colesterol-HDL em todos os grupos, sendo superior para os grupos que receberam rutina (34,84%) e rutina + naringina (34,62%). A atorvastatina utilizada como referência padrão demonstrou redução do colesterol e suas frações em todos os tempos, inclusive colesterol-HDL. Nas investigações histopatológicas, nenhuma alteração foi detectada nas artérias. Porém, observou-se deposição de gordura hepática, principalmente no estudo realizado em cobaias. Os resultados indicam que os flavonóides apresentam propriedades hipolipemiantes e sua utilização sugere efeitos benéficos na prevenção das doenças cardiovasculares.

## ABSTRACT

LUFT, Nair, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2003. **Effects of the flavonoids narigin and rutin in the lipid metabolism on birds and guinea pig.**  
Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Committee Members: Adelson Luis de Araújo Tinoco, Neuza Maria Brunoro Costa and Tanus Jorge Nagem.

The growing increase in the cardiovascular diseases prevalence has been considered a serious public health problem in Brazil and in the world. The arteriosclerosis is the basic unliking pathology of these diseases. Numerous studies has been showing a variety of biological activities of the flavonoids as antioxidants, hipolipemiant, antiphlogistics, antibacterial, anticancerous among others. The inverse relation between the consumption of the diet flavonoids and the cardiovascular diseases can be associated to its capacity of reducing the plasmatic concentrations of cholesterol and inhibit the LDL oxidation, avoiding the foamy cells build-up in the arteries and formation of arteriosclerotic lesions. Aiming these aspects, the lipopemiant effects of the narigin flavonoids and rutine were evaluated separately and in an associated way in animals for experimentation animals and laying hens, besides the histopathology of the hepatic and arterial tissues. The substances were tested in three experimental groups. 30 mg of narigin or 30 mg of rutin or 15 mg of narigin + 15 mg of rutin were supplied in a daily dose by means of capsule, during a period of six months in the two species. In the animals for experimentation, the hiperlipidemy was induced with 0,4 % of cholesterol + 0,1 % of colic acid, while in chickens the induction was accomplished with 1% of cholesterol. The sanguine dosages in animals for experimentation were made after 42 days of tratment, in chickens, they were made in three times: in the beginning of the experiment, after 21 and 42 days of treatment. According to the results obtained in the study accomplished with the animals for experimentation, it was concluded that the treatment with narigin (38,36%; 50,56%) it demonstrated a superior decrease to rutin (30,56%; 42,22%) or the association narigin + rutin (33,37%; 41,88%) for the concentrations of total LDL-cholesterol, respectively. Yet, narigin (15,15%) and narigin + rutin (14,30 %) showed a light reduction in the levels of HDL- cholesterol. In

the study accomplished with the laying hens, after 21 days of treatment, the narigin (43,63%; 49,57%) showed a larger efficiency in the reduction of the concentrations of the total cholesterol and no HDL- cholesterol and at 42 days, rutin (48,10%; 49,73%), it demonstrated a larger efficiency in the decrease of the total cholesterol concentrations and no HDL-cholesterol, and to the 42 days, rutin (48,10%; 49,73%) showed a superior decrease for these two parameters. Moreover, after 42 days of treatment, a decrease in the concentrations of HDL-cholesterol was observed in all the groups, being superior to the groups that received rutin (34,84%) and rutin + narigin (34,62%). The atorvastatin used as a standard reference, demonstrated a decrease of the cholesterol and its fractions in all the times, including the HDL-cholesterol. In the histopatologic investigations, no alteration was detected in the arteries. Yet, deposition of hepatic fat was observed, mainly in the study accomplished with the animals for experimentation. The results suggest that the flavonoids present hypolipidemic properties, and its use indicates beneficial effects in the prevention of the cardiovascular diseases.

## INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas, a prevalência das doenças cardiovasculares tem aumentado progressivamente, tornando-se um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Entre as patologias pertencentes ao grupo de doenças do aparelho cardiovascular, a aterosclerose é responsável por aproximadamente 50% do total das mortalidades nos Estados Unidos, Europa e Japão (WANG, 2001). No Brasil, 32% das mortalidades tem sido representadas por estas causas (Ministério da Saúde, 2001).

A aterosclerose é uma doença progressiva caracterizada pelo espessamento e acúmulo de lipídios na túnica íntima, principalmente nas artérias elásticas de grosso calibre (SCHWENKE, 1998; LUSIS, 2000). As células espumosas formadas pelo acúmulo de partículas de lipoproteínas captadas pelos macrófagos no conjuntivo subendotelial da camada íntima, representam a alteração morfológica mais precoce desta doença (SCHARTZ et al., 1991).

Estudos epidemiológicos, desde “Framingham” têm abordado os fatores de risco envolvidos na etiologia das doenças cardiovasculares (DAWBER, 1980). As concentrações plasmáticas de colesterol, distribuição do colesterol entre as lipoproteínas, pressão sanguínea e fumo são os principais fatores para o desenvolvimento prematuro da aterosclerose (CERVATO et al., 1997; SCHWENKE, 1998; LUSIS, 2000). Assim sendo, as concentrações elevadas de triacilgliceróis e colesterol-LDL e a redução das concentrações de colesterol-HDL são fatores de risco independentes na prevalência das doenças cardiovasculares em humanos (GENEST et al., 1992).

O aumento de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e suas modificações aterogênicas, como retenção, oxidação e agregação são consideradas os responsáveis pelos processos ateroscleróticos iniciais, através do acúmulo de colesterol nos macrófagos e a formação de células espumosas. Em contraste, as lipoproteínas de alta densidade (HDL) estão associadas com a atividade anti-aterogênica, pois removem o excesso de colesterol dos tecidos periféricos. Por esta razão, os níveis de HDL estão inversamente relacionados com o risco do desenvolvimento da aterosclerose (FUHRMAN et al., 2002; RADER, 2002).

Os flavonóides, que foram reconhecidos primitivamente como “vitamina P” (KUO, 1997), tiveram sua primeira publicação referente às atividades biológicas em 1936 por RUSZNYAK e SZENT-GYORGYI. Eles pertencem a um imenso grupo de compostos fenólicos, que são largamente distribuídos em alimentos de origem vegetal, e conferem sabores e pigmentações às plantas (BRAVO, 1998). Recentemente, o interesse pelos benefícios dos polifenóis, principalmente os flavonóides, têm aumentado pela observação de sua capacidade antioxidante e “scavenger” de radicais livres (ROSS e KASUM, 2002). Em 1993, HERTOOG et al. relataram uma associação inversa entre o consumo de flavonóides e a incidência de infarto do miocárdio bem como a redução da mortalidade por doenças coronarianas em uma ampla população humana. Subseqüentemente, vários investigadores têm avaliado os efeitos de flavonóides da dieta e flavonóides de extratos de plantas nos processos ateroscleróticos, utilizando animais como modelos experimentais. Muitos desses estudos demonstraram proteção significativa dos flavonóides aos danos vasculares (ANILA e VIJAYALAKSHMI, 2002; LEE et al., 2001; KIRK et al., 1998).

Segundo estudos epidemiológicos, experimentais e *in vitro*, os flavonóides previnem o desenvolvimento das doenças cardiovasculares reduzindo o colesterol no plasma, inibindo a oxidação do LDL pela ação antioxidante e alterando a produção de eicosanóides nas células endoteliais, pela ação antiinflamatória. Além disso, outros mecanismos que influenciam o desenvolvimento dessas doenças em humanos, como expressão dos receptores de adesão, replicação bacteriana, efeitos estrogênicos, enzimas proteolíticas e a replicação viral poderão ser inibidas ou minimizadas pelos flavonóides (FUHRMAN, 2001; SCHRAMM et al., 1998).

A hipercolesterolemia geralmente é acompanhada de concentrações elevadas de colesterol-LDL, e diversas formas de intervenções tanto preventivas quanto curativas para reduzi-las têm sido utilizadas. Intervenções medicamentosas mostram efeitos positivos, porém o custo elevado e os efeitos colaterais de diversas drogas têm despertado o interesse de pesquisadores em conhecer os efeitos de substâncias naturais na redução dos níveis de colesterol. Entre elas, os flavonóides tem demonstrado efeitos benéficos na proteção da doença aterosclerótica.

Este trabalho visa conhecer os efeitos dos flavonóides naringina e rutina no metabolismo lipídico em cobaias e aves. Ressalta-se a importância do conhecimento dos efeitos hipolipemiantes bem como estudos toxicológicos dessas substâncias em



diversas espécies antes de utilizá-las como fármacos na redução do risco das alterações do metabolismo relacionado às doenças cardiovasculares, principalmente as lesões ateroscleróticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANILA, L., VIJAYALAKSHMI, N.R. Flavonoids from *Emblica officinalis* and *Mangifera indica* – effectiveness for dyslipidemia. **J. of Ethnophar.** 79:81-87, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Anuário estatístico de saúde do Brasil: Mortalidade. 2001. [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br).

BRAVO, L.B. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutr. Rev.** 56:317-333, 1998.

CERVATO, A.M., MAZZILLI, R.N., MARTINS, I.S, et al. Dieta habitual e fatores de risco para doenças cardiovasculares. **Rev. de saúde Pública.** V. 31:227-235, 1997.

DAWBERT, T.R. The Framingham Study: O epidemiology of coronary heart disease. Cambridge, **Harvard University Press**, 1980.

FUHRMAN, B., AVIRAM, M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. **Curr. Opin. Lipidol.** 12:41-48, 2001.

FUHRMAN, B.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; et al. Antiatherosclerotic effects of licorice extract supplementation on hypercholesterolemic patients: increased resistance of LDL to atherogenic modifications, reduced plasma lipid levels and decreased systolic blood pressure. **Nutrition.** 18:268-273, 2002.

GENEST, J.J.; MARTIN-MULNEY, S.; McNAMARA, J.R., et al. Prevalence of familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. **Circulation.** 85:2025-2033, 1992.

HERTOG, M.G.; FESKINS, E.J.; HOLLMAN, P.C. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **Lancet.** 342:1007-1011, 1993

KUO, S.M. Dietary flavonoid and cancer prevention: evidence and potential mechanism. **Crit. Rev. Oncogen.** 8:47-69, 1997.

KIRK, E.A., SUTHERLAND, P., WANG, S.A. et al. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor – deficient mice. **J. Nutr.** 128:954-959, 1998.

LEE, C-H., JEONG, T-S., CHOI, Y-K. et al, Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, associated with hepatic ACAT and aortic VCAM-

1 and MPC-1 cholesterol-fed rabbits. **Biochem. and Biophys. Res. Commun.** 284:681-688, 2001.

LUSIS, A.J. Atherosclerosis. **Nature.** 407:233-241, 2000.

RADER, DJ. High-Density Lipoproteins and Atherosclerosis. **Am. J. Cardiol.** 90:62i-70i, 2002.

ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annu. Rev. Nutr.** 22:19-34, 2002.

RUSZNYAK, S.P.; SZENT-GYORGYI, A. Vitamin P: flavonols as vitamins. **Nature.** 138:27, 1936.

SCHARTZ CJ, VALENTE AJ, SPRAGUE EA - The pathogenesis of atherosclerosis. An overview. **Clin, Cardiol,** 14:11-16, 1991.

SCHRAMM. D.D.; GERMAN, J.B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. **J. Nutr. Biochem.** 9:560-566, 1998.

SCHWENKE, D.C. Antioxidants and atherogenesis. **J. Nutr. Biochem.** 9:424-445, 1998.

WANG, H.H. Analytical models of atherosclerosis. **Atherosclerosis.** 159:1-7, 2001.

## **ARTIGO I - LIPOPROTEÍNAS, FLAVONÓIDES E DOENÇAS CARDIOVASCULARES**

### **RESUMO**

LUFT, Nair<sup>1</sup>, OLIVEIRA, Tânia Toledo<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Nutrição e Saúde<sup>2</sup>, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal de Viçosa.

O crescente aumento na prevalência das doenças cardiovasculares tem sido considerado um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. A patologia básica que leva ao desenvolvimento destas doenças é a aterosclerose, caracterizada pelo acúmulo de lipídios na camada subendotelial com a formação subsequente da placa ateromatosa. Numerosos estudos vêm mostrando uma variedade de atividades biológicas dos flavonóides como antioxidantes, hipolipemiantes, antiinflamatórias, antibacterianas, anticancerígenas entre outras. A relação inversa entre o consumo de flavonóides da dieta e as doenças cardiovasculares pode estar associada a sua capacidade em reduzir os níveis plasmáticos de colesterol e inibir a oxidação da LDL, evitando assim, o acúmulo de células espumosas nas artérias e formação de lesões ateroscleróticas. Tendo em vista estes aspectos, esta revisão tem o objetivo de discutir estudos relacionados aos determinantes alimentares e metabólicos envolvidos com eventos que desencadeiam as doenças cardiovasculares, principalmente a aterosclerose, além dos mecanismos de ação que conferem efeitos benéficos aos flavonóides nestas patologias.

## ABSTRACT

LUFT, Nair<sup>1</sup>. OLIVEIRA, Tânia Toledo<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Nutrição e Saúde.  
<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal de Viçosa.

The growing increase in the prevalence of the cardiovascular diseases has been a serious problem of public health in Brazil and in the world. The basic pathology that takes to the development of these diseases is the arterosclerosis, characterized by the lipids accumulation in the subendothelial layer with the subsequent formation of the artheromatosal plaque. Numerous studies have been showing a variety of biological activities of the flavonoids as antioxidants, hipolipidemiantes, antiphlogistics, antibacterial, anticancerous among others. The inverse relation between the consumption of the diet flavonoids and the cardiovascular diseases can be associated to its capacity in reducing the plasmatic levels of cholesterol and to inhibit the oxidation of LDL, avoiding this way these aspects, this revisions has the objective of debating studies related to the dietary and metabolic determinants involved with the events that unchain the cardiovascular diseases, mainly the arterosclerosis, besides the action mechanism that check beneficial effects to the flavonoids in these pathologies.

## INTRODUÇÃO

As doenças do aparelho cardiovascular têm acometido grande proporção mundial do total das morbi-mortalidades em humanos adultos. A patologia básica que leva ao desenvolvimento dessas doenças é a aterosclerose, caracterizada pelo acúmulo de lipídios na camada subendotelial com a formação subsequente da placa ateromatosa (LUSIS, 2000). Ela é responsável por aproximadamente 50% do total das mortalidades nos Estados Unidos, Europa e Japão (WANG, 2001). No Brasil, 32% das mortalidades tem sido representadas pelas doenças cardiovasculares (Ministério da Saúde, 2001).

Existem evidências de que o início do processo de formação da placa ocorre na infância, progredindo lentamente até a vida adulta, quando ocorrerão as manifestações clínicas da doença (FRANÇOSO et al., 2002).

Diversas células e lipídios estão envolvidos na patogênese da placa aterosclerótica e trombos arteriais, incluindo lipoproteínas, colesterol, triacilgliceróis, plaquetas, monócitos, células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas. Além de apoproteínas e várias enzimas, que participam do metabolismo lipídico como apo B100, apo A-I, apo C-I, proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), lecitina colesterol acil transferase (LCAT), proteína microssomal de transferência de triacilgliceróis (MTP), lipase lipoprotéica (LPL), entre outras.

Entre os fatores de risco para aterosclerose, identificados através de estudos epidemiológicos, níveis elevados de lipoproteínas contendo apo B como as LDL, VLDL e apo(A) são considerados promotores desta doença independentes da presença de outros fatores (KWITEROVICH, 2000; SKALEN et al., 2002).

Os flavonóides, que compreendem a maior parte do grupo dos polifenóis encontrados em plantas, proporcionam grande parte dos sabores e cores em frutas e vegetais. Eles demonstram um crescimento evidente nos estudos, devido a várias atividades observadas com possíveis benefícios à saúde (ROSS e KASUM, 2002). BRAVO (1998) observou diversos efeitos em estudos *in vitro*, como; “scavenger” de radicais livres, modulação de atividades enzimáticas, inibição de proliferação celular, bem como seu potencial como antibiótico, antialérgico, antiúlcera, antidiarréico e antiinflamatório. Os efeitos que incluem suas atividades antioxidantes,

antiestrogênicas e antiproliferativas relacionam-se principalmente com os benefícios na redução de doenças cardiovasculares e câncer.

Em face ao crescente aumento das doenças que acometem o aparelho cardiovascular na atualidade, vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de melhor entender os fatores que afetam estas patologias. Esta revisão tem o objetivo de discutir estudos relacionados aos determinantes dietéticos e metabólicos envolvidos com eventos que desencadeiam as doenças cardiovasculares, principalmente a aterosclerose.

## **A DESCOBERTA DAS LIPOPROTEÍNAS**

A primeira suspeita da existência de um sistema de transporte de gorduras no sangue foi observada por BOYLE em 1665 (citado por OLSON, 1998), pela presença de um fluído leitoso na circulação de animais após uma refeição com gordura.

A presença de colesterol foi observada primariamente na bile e em cálculos biliares por POUILLIER DE LA SALLE em 1769 (citado por DAM, 1958) e por CHEVREUL em 1815, denominando-o de “colesterina”. Porém, sua presença no sangue somente foi detectada bem mais adiante (BOUDET, 1833). Em 1901, através de estudos realizados com plasma de cavalos, NERKING observou liberação de gordura através da digestão de proteínas com ácido clorídrico e pepsina e concluiu que os lipídios plasmáticos estariam ligados a proteínas.

No sangue de humanos, GAGE e FISH constataram em 1924, pequenas partículas de aproximadamente 1µm de diâmetro após uma refeição com gorduras, as quais foram nomeadas de quilomícrons.

MACHEBOEUF (1929), isolou uma lipoproteína sérica, estável e solúvel em água, por precipitação, a qual era composta por 59% de proteína e 41% de lipídios, com 18% de colesterol e 23% de fosfolipídios. Mais adiante, esta lipoproteína foi identificada como  $\alpha$ -globulina que tinha a mesma composição da  $\alpha$ -lipoproteína, hoje reconhecida como HDL. Em 1950, ONCLEY et al. isolaram uma  $\beta$ -globulina, composta por 23% de proteína, 30% de fosfolipídios, 8% de colesterol livre e 39% de

ésteres de colesterol, a qual é atualmente reconhecida como LDL. Ainda em 1950, GOFMAN et al. associaram certas frações de lipoproteínas com aterosclerose.

## METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS

As lipoproteínas são macromoléculas complexas com estruturas e composições heterogêneas, responsáveis pelo transporte das gorduras exógenas e endógenas (Figura 1). São classificadas de acordo com seu conteúdo lipídico, protéico, tamanho e densidade em quilomícrons (Qm), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (YE, 2000).

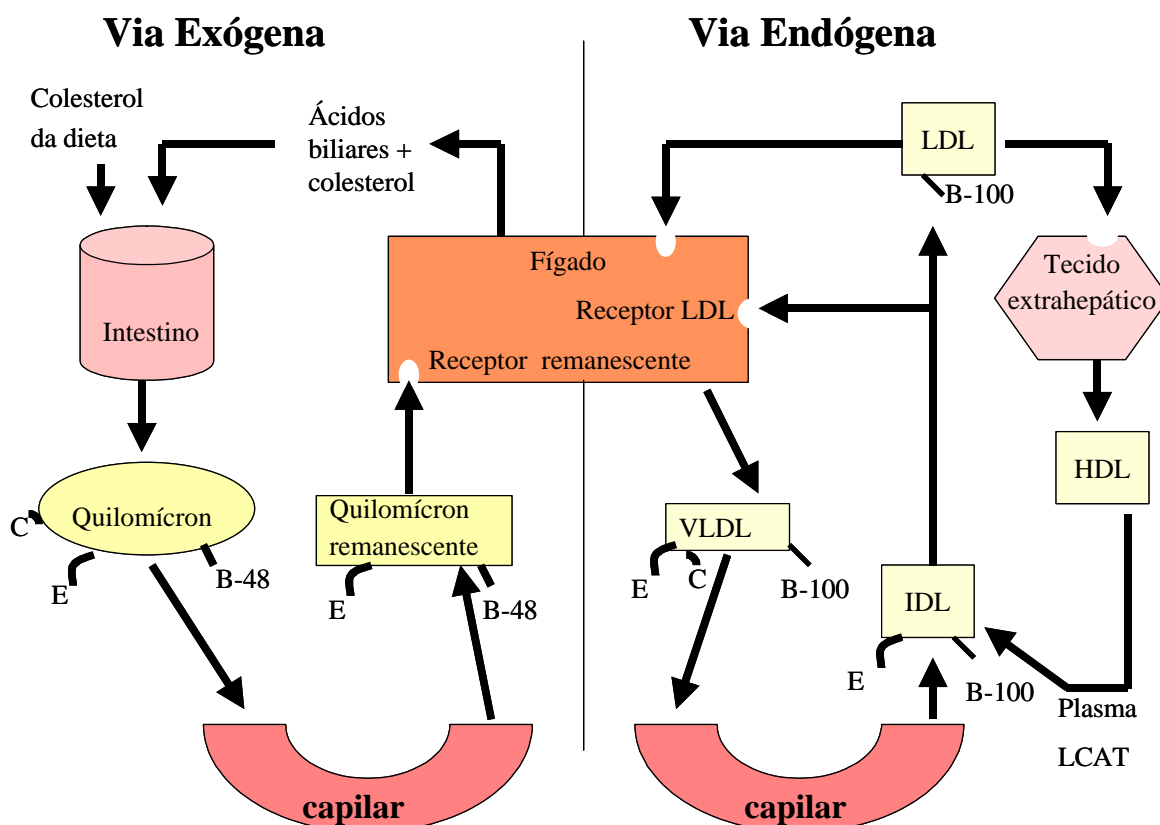


Figura 1 – Visão geral do metabolismo das lipoproteínas.

A porção protéica das lipoproteínas é composta por apolipoproteínas, que desempenham funções no metabolismo lipoprotéico ativando ou inibindo as enzimas

envolvidas no metabolismo lipídico ou por ligar-se aos receptores da superfície celular das lipoproteínas (YE, 2000). A classificação e as características das lipoproteínas estão resumidas no Quadro 1.

Quadro 1 – Características das lipoproteínas plasmáticas

	Quilomícron	VLDL	LDL	HDL
Mobilidade eletroforética	Origem	Pré-β	β	α
Densidade (mg/dL)	< 0,950	0,950-1,006	1,006-1,063	1,063-1,021
Composição dos lipídios (%)				
Colesterol livre	1,3	4,0	9,0	2,8
Colesterol esterificado	6,7	8,3	36,2	17,5
Fosfolípidos	7,3	24,7	24,1	18,5
Triacilgliceróis	84,7	52,5	9,0	4,6
Proteína	1,7	10,5	19,5	55,7
% do total da proteína				
APO B	5,20	40	95	Traço
APO A <sub>I</sub>	-	traço	traço	65
APO A <sub>II</sub>	11,6	traço	traço	25
APO C <sub>I</sub>	15	10	traço	2
APO C <sub>II</sub>	15	10	traço	2
APO C <sub>III</sub>	40	30	traço	6

Fonte: Adaptado de CISTERNAS (2002).



## **Transporte de gordura exógena**

As gorduras provenientes da dieta (triacilgliceróis, ésteres de colesterol e fosfolípidios), após sofrerem emulsificação pelos sais biliares e hidrólise pela lipase pancreática resultam em moléculas (ácidos graxos, monoacilgliceróis e colesterol) que são captadas pelas células intestinais. Os lipídios absorvidos no interior das células são reconvertidos em triacilgliceróis e junto com o colesterol são acrescidos de proteínas, sintetizadas pelas células intestinais (apo B-48), formando os quilomícrons (grandes partículas). Estes, ricos em triacilgliceróis e colesterol, entram na circulação linfática e atingem a corrente sanguínea através do ducto torácico, onde recebem apo A, C e E de outras lipoproteínas. A apo CII ativa a enzima lipase lipoprotéica, hidrolisando os triacilgliceróis presentes nos quilomícrons e liberando ácidos graxos livres, formando assim os quilomícrons remanescentes (partículas menores), os quais serão removidos pelo fígado através de receptores específicos onde serão metabolizados (YE, 2000; KWITEROVICH, 2000; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 1996).

Acredita-se que níveis elevados de triacilgliceróis, devido à remoção lenta dos quilomícrons remanescentes da circulação, poderão ser promotores da aterogênese. PATSCH et al. (1992) observaram que pacientes normais conseguiram atingir os níveis básicos de triacilgliceróis, após ingestão de gordura, mais rapidamente que pacientes que apresentavam doenças coronarianas.

## **Transporte de gordura endógena**

As gorduras captadas pelo fígado, provenientes dos quilomícrons remanescentes e de tecidos extra-hepáticos são sintetizadas e secretadas pelos hepatócitos, formando as VLDL que contêm triacilgliceróis e ésteres de colesterol no centro e são envolvidas por apo B-100, E, C-I, C-II e C-III na sua camada externa. Estas são lançadas na circulação, onde são hidrolisadas pela lipase lipoprotéica, que é ativada pela apo C II, liberando ácidos graxos livres e glicerol. Isto resulta na produção de VLDL remanescentes, também conhecidas como IDL. As partículas de IDL podem ser removidas pelo fígado através da interação de apo E com o receptor LDL ou convertidas em LDL, ricas em ésteres de colesterol, pela hidrólise de lipase

hepática. Estas LDL são normalmente removidas pela interação da apo B-100 com receptores LDL nas membranas celulares periféricas (KWITEROVICH, 2000; YE, 2000).

### **Transporte reverso do colesterol**

O colesterol livre é removido de tecidos extra-hepáticos pela transferência do colesterol através das membranas celulares pelo transportador ABC1 para a HDL nascente (REMALEY et al., 1999).

A HDL nascente é primariamente produzida no fígado e intestino e consiste basicamente de fosfolipídios, apo A-I e muito pouco colesterol não esterificado. Um ácido graxo livre da lecitina é transferido para o colesterol não esterificado da HDL nascente pela ação da lecitina colesterol acil transferase (LCAT) e seu cofator apo A-I, resultando na formação de uma partícula esférica de HDL (HDL madura). O colesterol não esterificado é removido de tecidos extra-hepáticos e esterificado pela LCAT e apo A-I produzindo uma partícula de HDL mais madura. Aproximadamente 50% do colesterol esterificado da HDL é captado pelo fígado através do receptor SRB-I (receptor “*scavenger*”, classe B, tipo I), onde será metabolizado (ACTON et al., 1996). Os outros 50% são transferidos pela proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) da HDL para lipoproteínas contendo apo B como VLDL, IDL e LDL (YE, 2000 et al.; KWITEROVICH, 2000).

### **ATEROSCLEROSE**

Aterosclerose é uma doença lenta e progressiva, que começa na infância e leva décadas para avançar. Sua patogênese é multifatorial, pois as lesões que se desenvolvem são resultantes do acúmulo de lipídios e colesterol, proliferação de células musculares lisas, macrófagos e linfócitos e, formação de células musculares lisas em uma matriz de tecido conjuntivo (ROSS, 1993). As principais artérias afetadas são a aorta, as artérias coronarianas e cerebrais.

Estudos em modelos animais têm esclarecido os eventos das lesões ateroscleróticas. A primeira alteração observada nas paredes arteriais, acompanhadas por ingestão elevada de gordura e colesterol na dieta é o acúmulo

de partículas de lipoproteínas e sua agregação na túnica íntima. Subseqüentemente, a aderência de monócitos na superfície do endotélio pode ser observada. Os monócitos migram através da camada endotelial para o conjuntivo subendotelial da túnica íntima, onde eles proliferam, se diferenciam em macrófagos, captando as lipoproteínas e formando as células espumosas. Com o passar do tempo, a morte das células espumosas contribui para o conteúdo necrótico no centro das lesões. Algumas estrias gordurosas acumulam células musculares lisas, que migram para a camada média, e com o acréscimo da secreção de elementos fibrosos desenvolvem placas fibrosas oclusivas. Inicialmente as lesões crescem em direção à camada adventícia, depois se expandem para o interior e invadem o lúmen da artéria (LUSIS, 2000).

Em humanos, as células espumosas e estrias gordurosas podem ser usualmente encontradas na aorta na primeira década de vida, as lesões intermediárias e o ateroma nas coronárias, surgem a partir da segunda ou terceira década, o fibroateroma e as lesões complicadas, nas artérias cerebrais, a partir da quarta década de vida (STARY et al., 1995; LUSIS, 2000).

A aterosclerose resulta em várias complicações patológicas podendo levar à morte. Quando ocorre nas artérias coronarianas, poderá resultar em cardiopatia isquêmica, que em sua forma mais grave, apresentando lesões arteriais complicadas por trombose poderá causar infarto do miocárdio, responsável por 20 a 25% das mortes nos Estados Unidos. Ao afetar os vasos cerebrais, ela se torna a principal responsável pelos acidentes vasculares cerebrais. Além disso, poderá causar isquemia do intestino, dos membros inferiores e aneurismas na aorta abdominal, que poderá resultar em hemorragia maciça fatal em conseqüência do seu rompimento (KUMAR et al., 1994).

Alguns fatores de risco para aterosclerose podem ter influência genética, como: níveis sanguíneos elevados de lipoproteína de baixa densidade/lipoproteína de muito baixa densidade (LDL/VLDL) por deficiência em seus receptores, redução dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL), níveis elevados de lipoproteína (A), pressão sanguínea elevada, níveis elevados de homocisteína, história familiar, diabetes, síndrome metabólica e gênero. Entre os fatores de influência ambiental se destacam, ingestão elevada de gordura na dieta, tabagismo, baixos níveis de antioxidantes, falta de exercício físico e agentes infecciosos (LUSIS, 2000).

Níveis elevados de colesterol plasmático estão associados com o aumento da incidência da aterosclerose, principalmente quando a maioria deste colesterol se encontra na fração de LDL. Estudos indicam que lipídios da dieta são determinantes das concentrações de colesterol LDL no plasma em animais e humanos. A ingestão de ácidos graxos saturados tem causado efeito hipercolesterolemiantes, enquanto que os ácidos graxos polinsaturados têm apresentado efeito inverso (McNAMARA, 1992). Da mesma forma, doses elevadas de colesterol na dieta, em estudos com modelos animais, têm demonstrado aumento de colesterol plasmático, ao contrário da ingestão de doses baixas ou moderadas (LIN et al., 1992).

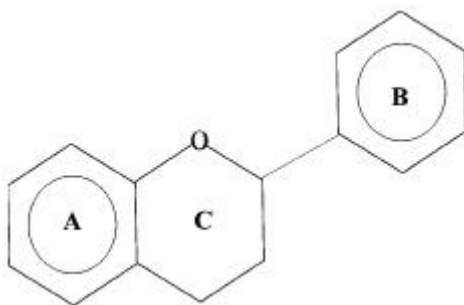
Evidências sugerem que a proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) poderá ter efeitos anti-aterogênicos ou aterogênicos, dependendo de sua atividade. A CETP é uma glicoproteína hidrofóbica que media a transferência ou troca de ésteres de colesterol e triacilgliceróis entre as lipoproteínas do plasma, ou seja, troca ésteres de colesterol da HDL por triacilgliceróis da VLDL (TALL, 1993).

A relação da CETP com aterosclerose foi estudada por QUINET et al. (1991), em macacos que receberam dietas elevadas em gordura e colesterol. Houve uma correlação positiva da CETP com aterosclerose, pois o aumento de sua atividade foi relacionado com o aumento das concentrações de LDL e a redução das concentrações da HDL. Em dislipidemias humanas associadas com aterosclerose, observou-se um aumento nas concentrações de CETP, bem como um aumento nas taxas de transferência de ésteres de colesterol da HDL para lipoproteínas contendo apo B (TALL, 1993). Em condições de exercício, o aumento de HDL e a redução de LDL colesterol, foram associados com a diminuição das concentrações da CETP (SEIP et al., 1993). Devido a isso, espécies animais, com exceção de cobaias, com baixos níveis de CETP plasmáticas apresentam resistência ao desenvolvimento da aterosclerose (TALL, 1993).

## FLAVONÓIDES

Os flavonóides são substâncias naturais que pertencem a um grande grupo de compostos fenólicos, largamente distribuídos em frutas, grãos, sementes, flores, cascas, raízes, chás e vinho (MIDDLETON et al., 1998), que foram reconhecidos primitivamente como “vitamina P”. A primeira observação em relação a suas atividades biológicas foi publicada em 1936 por RUSZNYAK e SZENT-GYORGYI. Atualmente mais de 5.000 variedades têm sido identificadas, muitas das quais são responsáveis pelo sabor e cor atrativa das flores, frutas e folhas (ROSS e KASUM, 2002; GROOT et al., 1998).

O núcleo comum dos flavonóides de fenilpropanóides (C6-C3-C6), consiste de dois anéis aromáticos ligados através de três carbonos (Figura 2). Podem ocorrer na forma aglicona ou glicosilada e diferem consideravelmente entre as classificações e substituições, incluindo glicosilação, hidrogenação, hidroxilação, metilação e sulfonação. Sua natureza química depende da classe estrutural, grau de hidroxilação e grau de polimerização (AHERNE et al., 2002). As atividades biológicas dos flavonóides e seus metabólitos dependem da estrutura química e de sua orientação na molécula.



**Figura 2** – Estrutura básica dos flavonóides.

Fonte: ROSS e KASUM, 2002.

Os flavonóides são subdivididos em seis grandes classes, baseados na variação heterocíclica do anel C. Entre as principais temos (Quadro 2) as antocianinas, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanas ou catequinas e flavonóis (ROSS e KASUM, 2002; PETERSON e DWYER, 1998).

**Quadro 2** - Principais classes e características dos flavonóides.

<b>Classes</b>	<b>Substâncias</b>	<b>Fontes</b>
Flavanonas	Hesperidina Naringenina Naringina	Alçaçuz, anis, hortelã, grão de bico e principalmente frutas cítricas.
Flavonas	Apigenina Luteolina	Salsa, alecrim, tomilho, grãos de cereais e ervas.
Flavonóis	Quercetina Rutina Kaempferol	Folhas de vegetais, cebola, pêra, milho, chá, cascas de frutas.
Isoflavonas	Daidzeina Genisteina Formonometina Biochanina A	Soja, feijões preto e verde, ervilha verde, brotos de trevo, brotos de alfafa, sementes de girassol, grão de bico.
Antocianinas	Cianidina Petunidina Peonidina Malvidina	Ameixa, berinjela, repolho roxo, cereja, rabanete, extratos de uva.
Flavanas	Catequinas Epicatequinas	Frutas e cereais: maçã, amora silvestre, groselha preta, uva, pêsego, morango, grãos de cevada, sorgo.

Fonte: adaptada, PETERSON e DWYER, 1998.

### **Propriedades dos flavonóides**

Os flavonóides exercem diversos efeitos biológicos, incluindo ações antibacterianas, antivirais, antiinflamatórias, antialérgicas e vasodilatadoras. São capazes de inibir a peroxidação lipídica, agregação plaquetária, permeabilidade e fragilidade capilar, bem como a atividade das ciclooxygenases e lipoxigenases.

Possuem propriedades antioxidantes, “*scavengers*” de radicais livres e quelantes de cátions divalentes (COOK et al., 1996).

A melhor propriedade descrita de quase todos os grupos de flavonóides é a sua ação antioxidante. Espécies reativas de oxigênio são formadas *in vivo* durante o metabolismo aeróbico normal e podem causar dano no DNA, em proteínas e lipídios, apesar de haver um sistema de defesa antioxidante natural. O acúmulo irreparável de produtos danosos poderá estimular o desenvolvimento de câncer, aterosclerose, diabetes e doenças inflamatórias crônicas (HALLIWELL, 1994). A maioria das classes de flavonóides tem apresentado atividades antioxidantes *in vitro*, porém as flavonas e as catequinas parecem ser os mais poderosos, por protegerem o organismo contra espécies reativas de oxigênio (NIJVELDT, 2001).

Pelo seu potencial antioxidante, os flavonóides poderão inibir a oxidação do LDL através de diversos mecanismos, como: “*scavengers*” de radicais livres atuando como agentes redutores, extinguindo a doação de moléculas como átomos de hidrogênio e oxigênio *singlet*, quelando íons metais de transição, reduzindo assim a capacidade de formação de radicais livres pelos metais; poupando a vitamina E e os carotenóides nas partículas de LDL, impedindo sua oxidação e preservando ou aumentando a atividade da paraoxanase sérica, promovendo assim a hidrólise de células arteriais e peróxidos associados a LDL (FUHRMAN e AVIRAM, 2001). Segundo HANASAKI et al. (1994), epicatequina e rutina demonstraram efeito benéfico como “*scavengers*” de radicais livres. Assim com, experimentos que utilizaram os flavonóides quercetina e ganhuangenina, inibiram a oxidação do LDL *in vitro* e *in vivo* (LIM et al., 1998). Além disso o consumo de nutrientes ricos em flavonóides, como extrato de gengibre e seus flavonóides gingerol e shagaol; extrato de soja e suas isoflavonas daidzeina e genisteina; polpa e suco de uva e suas catequinas, inibiram a oxidação do LDL *in vitro* e *in vivo* (FUHRMAN et al., 2000; STEIN et al., 1999; TIKKANEN et al., 1998).

Os flavonóides também exercem efeitos sobre a oxidação do LDL mediado pelos macrófagos. A capacidade dos macrófagos sobre a oxidação do LDL depende do estado oxidativo da célula, que é determinado pelo balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes celulares. Desta forma, os flavonóides poderão inibir as oxigenases celulares ou ativar antioxidantes celulares. Isto foi demonstrado através do consumo de flavonóides purificados como glabirdina, catequina ou quercetina, por

camundongos deficientes de Apo E, resultando na redução da capacidade dos macrófagos captarem o LDL e oxidá-lo (AVIRAM e FUHRMAN,1998).

Vários flavonóides, incluindo quercetina, reduziram o dano em isquemia por reperfusão, pelo aumento da atividade da óxido nítrico sintase. A liberação inicial de óxido nítrico é importante para manter a dilatação dos vasos, porém, a indução da produção excessiva da óxido nítrico sintase, nos macrófagos, poderá resultar em dano oxidativo. Nestas circunstâncias, a ativação dos macrófagos aumenta a produção de óxido nítrico e ânions superóxido, resultando no aumento da produção de peroxidonitrito, que poderá oxidar o LDL causando dano irreversível na membrana celular (NIJVELDT, 2001).

A via da xantina oxidase tem sido considerada uma rota importante no dano oxidativo de tecidos, especialmente após isquemia por reperfusão. A xantina oxidase e xantina desidrogenase são enzimas envolvidas no metabolismo da xantina para ácido úrico. Em condições fisiológicas, a enzima presente é a xantina desidrogenase, mas sua configuração é alterada para xantina oxidase. Em condições isquêmicas, tornando-se uma fonte de oxigênio para radicais livres, ou seja, na fase de reperfusão, ela reage com moléculas de oxigênio, liberando superóxidos de radicais livres. CHANG et al. (1993) observaram que os flavonóides quercetina e silibina apresentaram redução do dano oxidativo, pela redução da atividade da xantina oxidase.

A imobilização e adesão sólida de leucócitos nas paredes endoteliais são outro grande mecanismo responsável pela formação de radicais livres derivados de oxigênio, mas também são liberadores de antioxidantes citotóxicos e mediadores inflamatórios, além disso, realizam a ativação do sistema de complemento. Em condições normais, os leucócitos se movem livremente ao longo das paredes endoteliais. Entretanto, em condições de isquemia e inflamação, vários mediadores endoteliais e fatores de complemento podem causar adesão de leucócitos nas paredes endoteliais, resultando em imobilização dos mesmos, bem como estímulo e degranulação dos neutrófilos. Assim sendo, os oxidantes e mediadores inflamatórios são liberados causando danos aos tecidos. Segundo FRIESENEKER (1995, citado por NIJVELDT, 2001), a administração oral de flavonóides resultou na redução do número de leucócitos durante a fase de reperfusão. Ainda, quercetina e catequina



demonstraram inibição da agregação plaquetária em um estudo *in vitro* realizado por PIGNATELLI et al. (2000).

Outro possível mecanismo pelo qual os flavonóides podem atuar é através da interação com vários sistemas de enzimas. O ferro, na presença de espécies reativas de oxigênio poderá causar peroxidação lipídica. Porém, alguns flavonóides poderão quelar o ferro, removendo assim o fator causal do desenvolvimento de radicais livres. Conforme FERRALI et al. (1997), quercetina apresentou propriedades quelantes e estabilizantes do ferro.

Um efeito interessante dos flavonóides sobre a inibição das enzimas da rota do ácido araquidônico também têm sido observado. Esta característica lhes confere propriedades antiinflamatórias e anti-aterogênicas (FERRANDIZ, 1991).

Os flavonóides cítricos naringina e naringenina demonstraram efeito anti-aterogênico em coelhos com ingestão elevada de colesterol na dieta. Houve redução na atividade da enzima hepática acil CoA colesterol aciltransferase, redução na área de estrias gordurosas da aorta e redução dos níveis de expressão das moléculas de adesão das células vasculares (VCAM-1) e proteína quimiostática de monócitos (MCP-1) (LEE et al., 2001).

O efeito hipocolesterolemiantes de flavonóides cítricos foi testado em ratos, onde se observou redução do colesterol hepático e do plasma bem como do triacilglicerol hepático, também houve redução na atividade das enzimas 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase) e acil CoA colesterol aciltransferase (ACAT) (BOK et al., 1999).

Sucos cítricos, que contêm quantidades consideráveis de flavonóides hesperidina e naringina, também podem desempenhar propriedades hipocolesterolemiantes. KUROWSKA et al. (1997) mostraram que o suco de laranja reduziu o colesterol total no plasma e o suco de uva tendeu a reduzir o colesterol VLDL e LDL em ratos hipercolesterolêmicos. Ainda, KUROWSKA et al. (2000) realizaram um estudo com indivíduos hipercolesterolêmicos e observaram que o suco de laranja melhorou o perfil lipídico destes indivíduos através do aumento das concentrações do colesterol-HDL e redução do colesterol LDL.

Segundo SILVA (2001), frangos de corte apresentaram indução efetiva de hiperlipidemia através da suplementação do colesterol na dieta e os flavonóides rutina e naringina demonstraram redução significativa dos níveis plasmáticos de

colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-VLDL e triacilgliceróis, sem causar alterações nos níveis de colesterol-HDL. BOK et al (1999) observaram reduções significantes dos níveis de colesterol plasmático, colesterol hepático e triacilgliceróis hepáticos em ratos, através da utilização de uma mistura de flavonóides cítricos. Em estudo realizado por LEE et al (2001), coelhos com ingestão elevada de colesterol que receberam suplementação com flavonóides naringina e naringenina demonstraram que as estrias gordurosas na aorta foram significativamente menores em relação ao grupo controle.

As catequinas são o maior componente do chá, constituindo aproximadamente 30% do peso seco do chá verde e 9% do chá preto (HARBOWY e BALENTINI, 1997). Quercetina, kaempferol e miricetina são os flavonóides encontrados em concentrações consideráveis no chá. GELEIJNSE et al. (2002) realizaram um estudo de coorte prospectivo durante três anos para avaliar a ocorrência de doenças crônicas em uma população do distrito de Rotterdam, conhecido como “the Rotterdam Study”, e observaram uma associação inversa em relação ao consumo de chá e a incidência de infarto agudo do miocárdio na população estudada. Comparável a este estudo, a investigação dos fatores de risco para doenças crônicas por meio de um estudo longitudinal com uma população de homens idosos, envolvendo sete países durante cinco anos, denominado de “Zutphen Elderly Study”, a ingestão de chá demonstrou que a mortalidade por doença cardíaca isquêmica foi 50% menor do que nos indivíduos que não ingeriram chá (HERTOG et al., 1993).

Conforme resultados, GELEIJNSE et al. (2002) sugerem que a severidade das doenças cardiovasculares básicas pode ser modificada pela relação dos flavonóides com os eventos coronarianos. Também existe a possibilidade dos flavonóides juntamente com outros antioxidantes, reduzirem o stress oxidativo e prevenirem o dano excessivo após isquemia, aumentando assim a recuperação de um infarto do miocárdio, evitando eventos fatais.

## CONCLUSÕES

Estudos epidemiológicos evidenciando o consumo de alimentos e bebidas ricos em flavonóides, como frutas, vegetais chás e vinho, assim como pesquisas com modelos animais ou *in vitro* têm demonstrado diversos efeitos dos flavonóides na proteção das enfermidades que acometem o aparelho cardiovascular. Porém, muitas pesquisas ainda se fazem necessárias, para elucidar a absorção, o metabolismo, os mecanismos de ação e as interações dos flavonóides com outros nutrientes a longo prazo, para utilização dessas substâncias como compostos promissores na saúde humana.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTON, S., RIGOTTI, A., LANDSCHULZ, K.T., et al. Identification of scavenger receptor SR-B1 as a high density lipoprotein receptor. **Science**. 271:518-20, 1996.
- AHERNE, S.A., O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism. **Nutrition**. 18:75-81, 2002.
- AVIRAM, M., FUHRMAN, B. Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. **Atherosclerosis**. 137S:S45-S50, 1998.
- AVIRAM, M., FUHRMAN, B. LDL oxidation by arterial wall macrophages depends on the antioxidative status in the lipoprotein and in the cells: role of prooxidants vs. antioxidants. **Mol. Cell. Biochem**. 188:149-159, 1998.
- BRAVO, L.B. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutr. Rev**. 56:317-333, 1998.
- BOK, S.H.; LEE, S.H.; PARK, Y.B., et al. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl-CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. **Journal Nutrition**. 129:1182-1185, 1999.
- BOUDET, M.F. Nouvelle recherches sur la composition du serum du sang humain. **Ann. Chem. Phys**. 52:337-348, 1833.
- CHANG W.S., LEE, Y.J., LU, F.J. et al. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. **Anticancer Res**. 13:2165-2170, 1993.
- CHEVREUL, M.E. Recherches chimiques sur plusieurs corps gras, et particulièrement sur leurs combinaisons avec les alkalis. Cinquieme memoire. Des corps qu'on ont appelés adipocire, c'est-à-dire, de la substance cristallisée des calculs biliaires humains, du spermaceti et de la substance grasse des cadavres. **Ann. Chim**. 95:5-50, 1815
- CISTERNAS, J.R. Fisiologia das lipoproteínas plasmáticas. In: DOUGLAS C.R. **Tratado de fisiologia aplicada à nutrição**. São Paulo, p. 159-166, 2002.
- COOK, N.D.; SAMMAN, S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. **J. Nutr. Biochem**. 7:66-76, 1996.
- DAM, H. Historical introduction to cholesterol. In: **Chemistry, Biochemistry and Pathology** (R.P. Cook, ed.). Academic Press, New York. p 1-14, 1958.
- FERRALI, M., SIGNORINI, C., CACIOTTI, B. et al. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **FEBS Lett**. 416:123-129, 1997.

FERRANDIZ, M.L., ALCARAZ, M.J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agent Actions**. 32:283-288, 1991.

FRANÇOSO, L.A., COATES, V. Evidências anatomopatológicas do início da aterosclerose na infância e adolescência. **Arq. Bras. Cardiol**. 78:131-136, 2002.

FUHRMAN, B., ROSEMBLAT, M., HAYEK, T. et al. Dietary consumption of ginger extract attenuates development of atherosclerosis in the atherosclerotic apolipoprotein E deficient mice: hypocholesterolemic and antioxidative effects. **J. Nutr**. 130:1124-1131, 2000.

FUHRMAN, B., AVIRAM, M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. **Curr. Opin. Lipidol**. 12:41-48, 2001.

GAGE, S.H., FISH, P.A. Fat digestion, absorption and assimilation in man and animals as determined by a dark-field microscope and a fat-soluble dye. **Am. J. Anat**. 34:1-85, 1924.

GELEIJNSE, J.M., LAUNER, L.J., VAN DER KUIP, D.A.M., et al. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. **Am. J. Clin. Nutr**. 75:880-886, 2002.

GOFMAN, J.W., JONES, H.B., LINDGREN, F.T. et al. Blood lipids in human atherosclerosis. **Circulation**. 2:161-178, 1950.

GROOT, H.; RAUEN, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. **Fundam. Clin. Pharmacol**. 12:249-255, 1998.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? **Lancet**. 344:721-724, 1994.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radic. Biol. Med**. 16:845-850, 1994.

HARBOWY, M.E., BALENTINE, D.A. Tea chemistry. **Crit. Rev. Plant. Sci**. 16:415-480, 1997.

HERTOG, M.G., FESKENS, E.J., HOLLMAN, P.C. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **Lancet**. 342:1007-1011, 1993.

KUMAR, V., COTRAN, R.S., ROBBINS, S.L. Doenças dos vasos sanguíneos. **Patologia Básica**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara koogan. p.221, 1994.

KUROWSKA, E.M., BORRADAILE, N.M., MEADE, M. et al. Cholesterol lowering effects of dietary citrus juice and their flavonoids. Studies in rats, mice and rabbits. **Atherosclerosis**. 134:330, 1997 (Abs).

KUROWSKA, E.M.; SPENCE, J.D.; JORDAN, J., et al. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. **Am. J. Clin. Nutrition.** 72:1095-1100, 2000.

KWITEROVICH, P.O. The metabolic Pathways of High-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. **Am J. Cardiol.** 86S:5L-10L, 2000.

LEE, C.H.; JEONG, T.S.; CHOI, Y.K., et al. Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 284:681-688, 2001.

LIM, B.; YU, B.P.; CHO, S.I., et al. The inhibition by quercetin and ganhuangenin on oxidatively modified low density lipoprotein. **Phytotherapy Research.** 12:340-345, 1998.

LIN, E.C.K., FERNANDEZ, M.L., McNAMARA, D.J. Dietary fat type and cholesterol quantity interact to affect cholesterol metabolism in guinea pigs. **J. Nutr.** 122:2019-2029, 1992.

LUSIS, A.J. Atherosclerosis. **Nature.** 407:233-241, 2000.

MACHEBOEUF, M. Recherches sur les phosphoaminolipides et les steroids du serum et du plasma sanguins. II physiochimique de la fraction proteidique la plus riche en phospholipids et in sterides. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 11:485-503, 1929.

McNAMARA, D.J. dietary fatty acids, lipoproteins and cardiovascular disease. **Adv. Food Nutr. Res.** 36:253-361, 1992.

MIDDLETON, E.J. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Adv. Exp. Med. Biol.** 439:175-182, 1998.

NERKING, J. Ueber Fetteiweissverbindunge. **Pflugers. Archiv.** 85:330-344, 1901.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.; HOORN, D.E.C.; et al. Flavonois: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin. Nutr.** 74:418-425, 2001.

OLSON, R.E. Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. **J. Nutr.** 128:439S-443S, 1998.

ONCLEY, J.L., GURD, F.R.M., MELIN, M. Preparation on properties of serum and plasma proteins XXV. Compositin on properties of human serum  $\beta$ -lipoprotein. **J. Am. Chem. Soc.** 68:458-464, 1950.

PATSCH, J.R., MIESENBOCK, G., HOPFERWIESER, T. et al. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. **Arterioscler. Thromb.** 12:1336-345, 1992.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research.** 18:1995-2018, 1998.

PIGNATELLI, P., PULCINELLI, F.M., CELESTINI, A., et al. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. **Am. J. Clin. Nutrition.** 72:1150-1155, 2000.

QUINET, E., TALL, A. R., RAMAKRISHNAN, R. and RUDEL, L. Plasma lipid transfer protein as a determinant of the atherogenicity of monkey plasma lipoproteins. **J. Clin. Invest.** 87:1559-1566, 1991.

REMALEY, A.T., RUST, S., ROSIER, M., et al. Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 96:1268-269, 1999.

ROSS, J.A. and KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annu. Rev. Nutr.** 22:19-34, 2002.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature.** 362:801-809, 1993.

RUSZNYAK, S.P.; SZENT-GYORGYI, A. Vitamin P: flavonols as vitamins. **Nature.** 136:27, 1936.

SEIP, R. L., MOULIN, P., COCKE, T. et al. Exercise training induces falls in cholesteryl ester transfer protein. **Arterioscler. Thromb.** In press. 1993.

SILVA, R.R. Modelos de indução de hiperlipidemia e avaliação do efeito hipolipidêmico de flavonóides e corantes naturais em frangos de corte. Viçosa:UFV, 2001. 127p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.

SKALEN, K., GUSTAFSSON, M., RYDBERG, E.K. et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. **Nature.** 417:750-754, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. 2º Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias. **Arq. Bras. Cardiol.** 67:1-16, 1996.

STARY, H.C., CHANDLER, A.B., DINSMORE, R.E., et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: areport from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis. **Circulation.** 92:1355-74, 1995.

STEIN, J.H., KEEVIL, J.G., WIEBE, D.A. et al. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery diseases. **Circulation**. 100:1050-1055, 1999.

TALL, A.R. Plasma cholesteryl ester transfer protein. **J. Lipid Res**. 34:1255-1274, 1993.

TIKKANEN, M.J., WAHALA, K., OJALA, S. Et al. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 95:3106-3110, 1998.

WANG, H.H. Analytical models of atherosclerosis. **Atherosclerosis**. 159:1-7, 2001.

YE, S.Q. & KWITEROVICH, P.O.JR. Influence of genetic polymorphisms on responsiveness to dietary fat and cholesterol. **Am J. Clin Nutr**. 72:1275S-84S, 2000.



## ARTIGO 2 - EFEITOS DOS FLAVONÓIDES NARINGINA E RUTINA NO METABOLISMO LIPÍDICO EM COBAIAS (*Cavia porcellus*)

### RESUMO

LUFT, Nair, M.S., OLIVEIRA, Tânia Toledo. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2003. **Efeitos dos flavonóides naringina e rutina no metabolismo lipídico em cobaias (*Cavia porcellus*)**

Este estudo foi realizado para testar os efeitos dos flavonóides, rutina e naringina, na redução das concentrações de lipídios plasmáticos e investigar a histopatologia dos tecidos hepáticos e arteriais em cobaias. A hiperlipidemia foi induzida com 0,4% de colesterol + 0,1% de ácido cólico. Foram utilizados 35 animais divididos em cinco grupos. O grupo testemunha recebeu somente ração, o grupo controle recebeu ração e colesterol + ácido cólico. Os outros três grupos receberam ração e colesterol + ácido cólico, além de flavonóides: 30mg de naringina ou 30 mg de rutina ou 15mg de naringina + 15 mg de rutina. As dosagens sanguíneas foram efetuadas após 42 dias de tratamento. De acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que o tratamento com naringina apresentou uma redução superior (38,36%; 50,56%) a rutina (30,56%; 42,22%) ou a associação de naringina + rutina (33,77%; 41,88%) para os níveis de colesterol total e colesterol-LDL respectivamente. Porém, naringina (15,15%) e naringina + rutina (14,30%) apresentaram uma leve redução nos níveis de colesterol-HDL. Nas investigações histopatológicas, nenhuma alteração foi detectada nas artérias. No entanto, observou-se deposição de gordura hepática em todos os grupos que receberam colesterol. Os resultados indicam que essas substâncias apresentam propriedades hipolipemiantes e sua utilização proporciona efeitos benéficos na prevenção das doenças cardiovasculares.

## ABSTRACT

LUFT, Nair, M.S. OLIVEIRA, Tânia Toledo. Universidade Federal de Viçosa, July, 2003. **Effects of the flavonoids narigin and rutin in the lipid metabolism on guinea pig (*Cavia porcellus*)**

This study was accomplished to test the effects of the flavonoids, rutin and narigin, in the decrease of the plasmatic lipids concentrations and to investigate the histopathology of the hepatic and arterial tissues in animals for experimentation. The hiperlipidemy was induced with 0,4 % of cholesterol + 0,1 % of colic acid. Thirty-five animals divided in five groups were used. The witness group received only ration, the control group received ration and cholesterol + colic acid. The other three groups received ration and cholesterol + colic acid, besides the flavonoids, 30 mg of narigin or 30 mg of rutin or 15 mg of narigin + 15 mg of rutin. The sanguine dosages were made after 42 days of treatment. According to the obtained results, it is concluded that the treatment with narigin demonstrated most decrease (38,36%; 50,56%), the rutin (30,56%; 42,22%) or the association narigin + rutin (33,77%; 41,88%) for the levels of total cholesterol and LDL-cholesterol respectively. Yet, narigin (15,15%) and narigin + rutin (14,30%) they showed a light reduction in the levels of HDL-cholesterol. In the Histopathologic investigations, no alteration suggest that those substances present hipolipemiant properties and its use indicates beneficial effects in the prevention of the cardiovascular diseases.

## 1 – INTRODUÇÃO

Pesquisas realizadas ao longo dos últimos anos relacionadas com a prevenção primária e secundária da doença arterial coronariana (DAC) e, em particular, da aterosclerose, confirmaram por meio de resultados consistentes, que alterações do perfil lipídico constituem um fator de risco indiscutível para complicações cardiovasculares de natureza aterosclerótica (PENA et al., 1999; VERHAMME et al., 2002).

Estudos revelam que a ingestão elevada de colesterol e gordura saturada na dieta elevam os índices sanguíneos de colesterol (FERNANDEZ et al., 1999; PENA et al., 1999; FERNANDEZ, 2001; VERHAMME et al., 2002). A associação entre as concentrações séricas de colesterol e aterosclerose é reforçada quando as frações de lipoproteínas são avaliadas. As concentrações de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) apresentam uma correlação positiva, ao passo que lipoproteínas de alta densidade (HDL) estão inversamente correlacionadas com o desenvolvimento das doenças cardiovasculares (GRUNDY et al., 1990; XU et al., 1998). Ainda, segundo HEGSTED et al. (1993), a ingestão de colesterol e gordura saturada na dieta exercem influência sobre os níveis de LDL, porém não alteram a concentração de HDL.

Os flavonóides são substâncias naturais freqüentemente encontradas em alimentos como frutas, legumes, verduras, grãos, raízes, chás e vinho (COOK e SAMMAN, 1996; MIDDLETON, 1998; MERKEN e BEECHER, 2000). Frutas cítricas contêm vários flavonóides entre eles a naringina, que pertence à classe das flavononas. A rutina, da classe dos flavonóis é encontrada em frutas e vegetais como cebola, pêra, milho, chá entre outros, principalmente na casca e nas folhas (PETERSON et al., 1998).

Pesquisas têm avaliado os mecanismos de ação de flavonóides no metabolismo lipídico. A relação inversa entre o consumo de flavonóides e doenças cardiovasculares (HERTOG et al., 1993) pode estar associada à capacidade destas substâncias em reduzir a oxidação do LDL, que conseqüentemente reduzirá a formação de células espumosas e da aterosclerose (FUHRMAN, 2001).

Modelos animais apropriados para estudar o efeito de drogas e dietas sobre as concentrações dos lipídios plasmáticos e da sua influência na aterosclerose, têm sido uma busca constante entre os pesquisadores. Porém, a falta de similaridade do perfil de lipoproteínas plasmáticas ou da atividade de enzimas regulatórias do colesterol hepático e do metabolismo de lipoproteínas têm mostrado desvantagens na utilização de alguns modelos animais. Ainda, os estudos para avaliar estes efeitos, requerem animais pequenos e que respondam rapidamente aos tratamentos (FERNANDEZ et al., 1999).

Cobaias são um modelo bem aceito para o estudo da hipercolesterolemia e aterosclerose, devido à semelhança ao metabolismo lipídico humano em diversos fatores (VAN et al., 1991). Esses animais respondem bem a intervenções dietéticas e medicamentosas reduzindo os níveis sanguíneos de colesterol LDL; atingem a maioria do colesterol sanguíneo na forma de LDL; apresentam maiores concentrações de colesterol livre do que esterificado no fígado; apresentam atividade da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), lecitina colesterol acil-transferase (LCAT), e lipase lipoprotéica (LPL); sintetizam e catabolizam taxas moderadas de colesterol hepático; não sintetizam vitamina C; fêmeas apresentam maiores concentrações de HDL do que machos; reduzem os níveis de triacilglicerol e aumentam os níveis de HDL através de exercício físico (FERNANDEZ, 2001).

Este trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos dos flavonóides naringina e rutina nas concentrações sanguíneas do colesterol total e frações, glicose e triacilgliceróis, bem como as alterações das células hepáticas e arteriais ocasionadas em cobaias com hipercolesterolemia induzida via oral.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

O ensaio biológico e a análise dos parâmetros sanguíneos dos animais foram realizados no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. A análise histopatológica foi realizada no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

## 2.1 - Ensaio biológico

Neste estudo experimental foram utilizados 42 cobaias (*Cavia porcellus*), 29 machos e 13 fêmeas com idade média de 3 meses e peso médio 311g. Os animais foram adquiridos no Mercado Central de Belo Horizonte, Minas Gerais. Os mesmos foram mantidos em uma sala com gaiolas individuais, ciclo claro/escuro de 12 horas e alimentação e água *ad libitum*. Durante o período de adaptação de 10 dias, todos receberam dieta comercial da marca Purina. Após este período, foram constituídos 6 grupos experimentais, com 7 animais em cada, distribuídos ao acaso e submetidos aos tratamentos descritos a seguir. O grupo testemunha foi composto por 3 fêmeas e 4 machos e os demais por 2 fêmeas e 5 machos.

O grupo 1 (testemunha) recebeu somente ração básica; o grupo 2 (controle) recebeu ração básica + 0,4% de colesterol + 0,1% de ácido cólico; o grupo 3 recebeu ração básica + 0,4% de colesterol + 0,1% de ácido cólico e 30mg de naringina em forma de cápsulas; o grupo 4 recebeu ração básica + 0,4% de colesterol + 0,1% de ácido cólico e 30mg de rutina em forma de cápsulas; o grupo 5 recebeu ração básica + 0,4% de colesterol + 0,1% de ácido cólico + 15mg de rutina e 15mg da naringina em forma de cápsulas; o grupo 6 recebeu ração básica + 0,4% de colesterol + 0,1% de ácido cólico + 10mg de atorvastatina em forma de comprimidos. O Quadro 1 resume os grupos e os tratamentos aos quais os animais foram submetidos, recebendo uma dosagem diária de cada substância durante 42 dias.

Segundo LIN et al. (1995), a utilização de 0,33% colesterol na dieta corresponde a uma quantidade três vezes superior a síntese endógena em cobaias. Baseado nessas informações utilizamos 0,4% de colesterol, além de 0,1% de ácido cólico conforme COSTA (1992) para indução de hiperlipemia. HERTOOG et al. (1930) observou uma ingestão de 25mg de flavonóides por meio de história da dieta. Tendo em vista esses resultados, utilizamos 30mg de flavonóides para testar o efeito destas substâncias em nosso estudo.

O peso e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente, com o objetivo de avaliar o ganho de peso e o coeficiente de eficiência alimentar.

Quadro 1 – Tratamentos das cobaias conforme distribuição nos grupos.

<b>GRUPO</b>	<b>TRATAMENTO</b>
G 1	Ração básica
G 2	Ração básica + colesterol + ácido cólico
G 3	Ração básica +colesterol + ácido cólico + naringina
G 4	Ração básica + colesterol + ácido cólico + rutina
G 5	Ração básica +colesterol + ácido cólico + naringina + rutina
G 6	Ração básica + colesterol + ácido cólico + atorvastatina

## **2.2 - Substâncias Utilizadas**

Para indução da hiperlipemia foi efetuada uma associação de ácido cólico e colesterol cristalino da marca VETEC, pois o ácido cólico atua na emulsificação das gorduras facilitando assim absorção do colesterol.

Para testar a redução da hiperlipemia foram utilizados os flavonóides Naringina (N 1376) e Rutina (R 5143) da marca Sigma, isolados e de forma associada.

## **2.3 - Dosagens sanguíneas**

No final do experimento, após 12 horas de jejum, os animais foram anestesiados com éter etílico e as amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, para dosagens de colesterol total, colesterol-HDL, triacilglicerol e glicose. As mesmas foram centrifugadas em equipamento Excelsa 2 205 N a 7.100 X g, durante 15 minutos, para obtenção do soro. As dosagens sorológicas foram efetuadas em equipamento multiparamétrico de Bioquímica Alizé, Mod Lisabio B.652 e kits da marca BioMérieux e os resultados expressos em mg/dL. O colesterol-LDL e VLDL foram estimados segundo fórmula de Friedewald (QUINTÃO, 1992).

### **2.3.1 – Determinação dos níveis sanguíneos de colesterol total, glicose e triacilglicerol**

Para análise do colesterol total foi utilizado o método enzimático com o kit 61224 da BioMérieux, conforme ALLAIN et al (1974) em um comprimento de onda de 500nm. A glicose foi analisada com o kit 61273 da BioMérieux, conforme BONDAR et al. (1974). A dosagem dos triacilgliceróis séricos foi efetuada por via enzimática, utilizando o kit 61236 da BioMérieux, conforme FOSSATI e PRENCIPE (1982) e as leituras de absorbância foram feitas a um comprimento de onda de 505nm.

### **2.3.2 - Determinação do colesterol-HDL**

A dosagem do colesterol-HDL foi realizada pelo método enzimático com o Kit 6153, conforme ALLAIN et al (1974). Esse método baseia-se na precipitação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) contidas na amostra. Esta precipitação é obtida pela adição de ácido fosfotúngstico em presença de íon magnésio. Antes que o equipamento possa efetuar a leitura do colesterol-HDL, em cada amostra, adiciona-se 50 µl do reativo precipitante (ácido fosfotúngstico e  $MgCl_2 \cdot CH_2O$  pH 6,2) em 500µl de soro. O sobrenadante obtido por centrifugação contém as lipoproteínas de alta densidade (HDL), cujo colesterol é determinado pelo mesmo processo já descrito para a determinação do colesterol total (ASSMAN et al., 1983).

### **2.3.3 - Estimativa de colesterol-VLDL**

Os valores de VLDL foram estimados em função do teor de triacilgliceróis, de acordo com a fórmula de Friedwald (QUINTÃO, 1992).

$$VLDL = \text{triacilglicerol} / 5$$

#### **2.3.4 - Estimativa de colesterolo-LDL**

Os valores de LDL foram estimados, de acordo com a fórmula de Friedwald (QUINTÃO, 1992), por meio da equação:

$$\text{LDL} = \text{Colesterol total} - \text{HDL} - (\text{TG}/5)$$

Onde os valores de HDL, VLDL, colesterol total e triglicérides foram previamente obtidos, como mencionado anteriormente.

#### **2.4 - Análise histopatológica do fígado e arco aórtico dos animais**

Após o término dos experimentos, foram coletadas amostras de fígado e arco aórtico dos animais, numa repetição de quatro amostras para cada grupo, escolhidos ao acaso, a fim de proceder à análise histopatológica, verificando-se deste modo o acúmulo de gordura hepática, caracterizada patologicamente como esteatose hepática e alteração nas camadas da túnica íntima do arco aórtico. Estes cortes de tecido foram fixados em formol tamponado 10% por 24-48 horas, passando para o álcool 70%. Após foram incluídos em parafina, seccionados a 5 µm de espessura em micrótomo rotativo American Optical Company, e corados em hematoxilina e eosina a 1%. As lâminas foram analisadas qualitativamente de acordo com a quantidade de gotículas de gordura depositadas nos tecidos para cada grupo, tendo sido comparadas umas às outras e aos grupos controle.

##### **2.4.1 - Confeção das lâminas**

Fragmentos foram coletados e desidratados em álcoois, do 70 ao 95%, passando após pelo álcool absoluto três vezes. Passaram por uma mistura de álcool + xilol e por xilol três vezes. O tempo de permanência em cada solução alcoólica foi de 30 min para os álcoois 70 a 95%, 1 h para cada banho de álcool absoluto, 30 min para a mistura de álcool + xilol e 50 min para cada banho de xilol. Foram imersos em parafina três vezes e incluídos na terceira solução de parafina de um dia para o outro. O tempo de permanência para cada banho de parafina foi de 1h. No dia seguinte, foram adaptados em suportes de madeira e levados desta forma para o



micrótomo rotativo manual (American Optical Company), onde foram cortados e colocados nas lâminas. Procedeu-se o processo de desparafinização e hidratação destes cortes pelo xilol (2 banhos de 10 minutos), álcoois absoluto I II, 95%, 80% e 70% (3 minutos em cada) e água (5 minutos). As lâminas foram coradas com hematoxilina durante 1min e eosina durante 30 segundos, deixados em água corrente e após, montagem, secagem, analisadas ao microscópio Olympus BX 40.

## **2.5 - Análise Estatística**

O experimento foi realizado segundo o delineamento inteiramente casualizado.

Os dados foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA), e as médias dos grupos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) e pelo percentual de variação em relação ao grupo controle.

As análises foram efetuadas através do programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas) (RIBEIRO, 2001).

### 3 – RESULTADOS

#### 3.1 – Dosagens sanguíneas, ganho de peso, ingestão alimentar e coeficiente de eficiência alimentar

De acordo com os resultados obtidos, não houve diferença estatística entre os grupos após 42 dias de tratamento, quanto aos valores médios de glicose do soro sanguíneo das cobaias (Tabela 1). Porém, o grupo 4, que recebeu rotina, apresentou uma leve redução de nas concentrações de glicose (12,85%), em relação ao grupo controle

Tabela 1 – Médias de glicose em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo padrão (G1) e grupo controle (G2) de cobaias submetidas aos tratamentos durante 42 dias.

Tratamento	Glicose	% de Variação	
		G1	G2
G1 – R	142,27 ± 41,86 <sup>a</sup>	-	-
G2 – R+C+AC	148,23 ± 34,45 <sup>a</sup>	+4,19	-
G3 – R+C+AC+N	144,35 ± 75,52 <sup>a</sup>	+1,46	-2,62
G4 – R+C+AC+R	129,18 ± 33,21 <sup>a</sup>	-9,20	-12,85
G5 – R+C+AC+NR	147,83 ± 13,25 <sup>a</sup>	+3,90	-0,27

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

R = ração básica

C = colesterol

AC = ácido cólico

N = naringina

R = rotina

NR = naringina + rotina

Apesar das concentrações de triacilgliceróis, registrados na Tabela 2, não apresentarem diferenças estatisticamente significativas, houve uma redução em

relação ao grupo controle, de 16,00% e 24,29% para os animais tratados com o flavonóide rutina (grupo 4) e a associação rutina + naringina (grupo 5), respectivamente.

Tabela 2 – Médias de triacilglicerol em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo padrão (G1) e grupo controle (G2) de cobaias submetidas aos tratamentos durante 42 dias.

Tratamento	Triacilglicerol	% de Variação	
		G1	G2
G1 – R	74,66 ± 14,50 <sup>a</sup>	-	-
G2 – R+C+AC	81,03 ± 50,32 <sup>a</sup>	+8,53	-
G3 – R+C+AC+N	72,91 ± 18,03 <sup>a</sup>	-2,34	-10,02
G4 – R+C+AC+R	68,06 ± 17,63 <sup>a</sup>	-8,84	-16,00
G5 – R+C+AC+NR	61,35 ± 17,49 <sup>a</sup>	-17,83	-24,29

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

R = ração básica

C = colesterol

AC = ácido cólico

N = naringina

R = rutina

NR = naringina + rutina

Os resultados representados na Tabela 3 mostram variações nos valores médios de colesterol total. Observou-se que a suplementação de colesterol induziu a hiperlipemia em cobaias, elevando significativamente o teor sanguíneo de colesterol do grupo controle (grupo 2), apresentando um aumento superior a 3 vezes em comparação ao grupo testemunha (grupo 1), que recebeu apenas ração;. Obteve-se um resultado com maior relevância para o grupo tratado com o flavonóide naringina (grupo 3), pois demonstrou uma redução de 38,36% do colesterol total em comparação com o grupo controle (grupo 2). Os grupos tratados com rutina (grupo 4) e a associação de rutina + naringina (grupo 5), também apresentaram reduções consideráveis, 30,53% e 33,77%, respectivamente.

Tabela 3 – Médias de colesterol total em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo padrão (G1) e grupo controle (G2) de cobaias submetidas aos tratamentos durante 42 dias.

Tratamento	Colesterol Total	% de Variação	
		G1	G2
G1 – R	45,53 ± 12,40 <sup>b</sup>	-	-
G2 – R+C+AC	162,97 ± 69,29 <sup>a</sup>	+257,94	-
G3 – R+C+AC+N	100,46 ± 23,25 <sup>a,b</sup>	+120,64	-38,36
G4 – R+C+AC+R	113,22 ± 47,54 <sup>a</sup>	+148,67	-30,53
G5 – R+C+AC+NR	107,94 ± 27,96 <sup>a,b</sup>	+137,07	-33,77

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

R = ração básica

C = colesterol

AC = ácido cólico

N = naringina

R = rutina

NR = naringina + rutina

O grupo controle (Grupo 2), que recebeu suplementação de colesterol, demonstrou um aumento significativo dos níveis de colesterol-LDL, em comparação com o grupo 1 (testemunha), conforme resultados apresentados na Tabela 4 . Em relação aos tratamentos, a melhor eficiência foi do flavonóide naringina (grupo 3), que atingiu uma redução de 50,56%. A rutina (grupo 4) e a associação rutina + naringina (grupo 5) também demonstraram efeitos consideráveis na redução da LDL, 42,22% e 41,88%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle (grupo 2) .

Tabela 4 – Médias de colesterol-LDL em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo padrão (G1) e grupo controle (G2) de cobaias submetidas aos tratamentos durante 42 dias.

Tratamento	Colesterol-LDL	% de Variação	
		G1	G2
G1 – R	18,58 ± 11,74 <sup>b</sup>	-	-
G2 – R+C+AC	109,03 ± 60,70 <sup>a</sup>	+486,81	-
G3 – R+C+AC+N	53,90 ± 30,04 <sup>a b</sup>	+190,10	-50,56
G4 – R+C+AC+R	63,00 ± 39,38 <sup>a b</sup>	+239,07	-42,22
G5 – R+C+AC+NR	63,37 ± 31,60 <sup>a b</sup>	+241,06	-41,88

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

R = ração básica

C = colesterol

AC = ácido cólico

N = naringina

R = rutina

NR = naringina + rutina

Conforme resultados demonstrados nas Tabelas 5 e 6, não houve diferença entre os grupos referente aos valores de colesterol-HDL e colesterol-VLDL. Porém, observou-se uma redução considerável de 24,26% para o VLDL, no grupo tratado com rutina + naringina.

Tabela 5 – Médias de colesterol-HDL em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo padrão (G1) e grupo controle (G2) de cobaias submetidas aos tratamentos durante 42 dias.

Tratamento	Colesterol-HDL	% de Variação	
		G1	G2
G1 – R	12,01 ± 6,01 <sup>a</sup>	-	-
G2 – R+C+AC	37,69 ± 31,73 <sup>a</sup>	+214,08	-
G3 – R+C+AC+N	31,98 ± 20,51 <sup>a</sup>	+166,50	-15,15
G4 – R+C+AC+R	36,60 ± 22,19 <sup>a</sup>	+105,00	-2,89
G5 – R+C+AC+NR	32,30 ± 20,66 <sup>a</sup>	+169,16	-14,30

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

R = ração básica

C = colesterol

AC = ácido cólico

N = naringina

R = rutina

NR = naringina + rutina

Tabela 6 – Médias de colesterol-VLDL em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo padrão (G1) e grupo controle (G2) de cobaias submetidas aos tratamentos durante 42 dias.

Tratamento	Colesterol-VLDL	% de Variação	
		G1	G2
G1 – R	14,93 ± 2,90 <sup>a</sup>	-	-
G2 – R+C+AC	16,20 ± 10,06 <sup>a</sup>	+8,50	-
G3 – R+C+AC+N	14,58 ± 3,60 <sup>a</sup>	-2,34	-10,00
G4 – R+C+AC+R	13,61 ± 3,52 <sup>a</sup>	-8,84	-15,99
G5 – R+C+AC+NR	12,27 ± 3,50 <sup>a</sup>	-17,82	-24,26

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

R = ração básica

C = colesterol

AC = ácido cólico

N = naringina

R = rutina

NR = naringina/rutina

A ingestão alimentar, a média de ganho de peso e o coeficiente de eficiência alimentar foram semelhantes em todos os grupos, durante os 42 dias de tratamento (Tabela 7).

Tabela 7 – Médias de ganho de peso (GP), coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e ingestão alimentar (IA) de cobaias submetidas aos tratamentos durante 42 dias.

Tratamento	GP	IA	CEA
G1 – R	119,28 ± 44,01 <sup>a</sup>	1010,27 ± 128,24 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,04 <sup>a</sup>
G2 – R+C+AC	80,71 ± 30,19 <sup>a</sup>	945,90 ± 194,41 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,03 <sup>a</sup>
G3 – R+C+AC+N	94,28 ± 61,87 <sup>a</sup>	976,36 ± 254,40 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,06 <sup>a</sup>
G4 – R+C+AC+R	109,28 ± 36,22 <sup>a</sup>	966,85 ± 176,43 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,04 <sup>a</sup>
G5 – R+C+AC+NR	100,00 ± 50,17 <sup>a</sup>	1007,17 ± 258,80 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,03 <sup>a</sup>

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

R = ração básica

C = colesterol

AC = ácido cólico

N = naringina

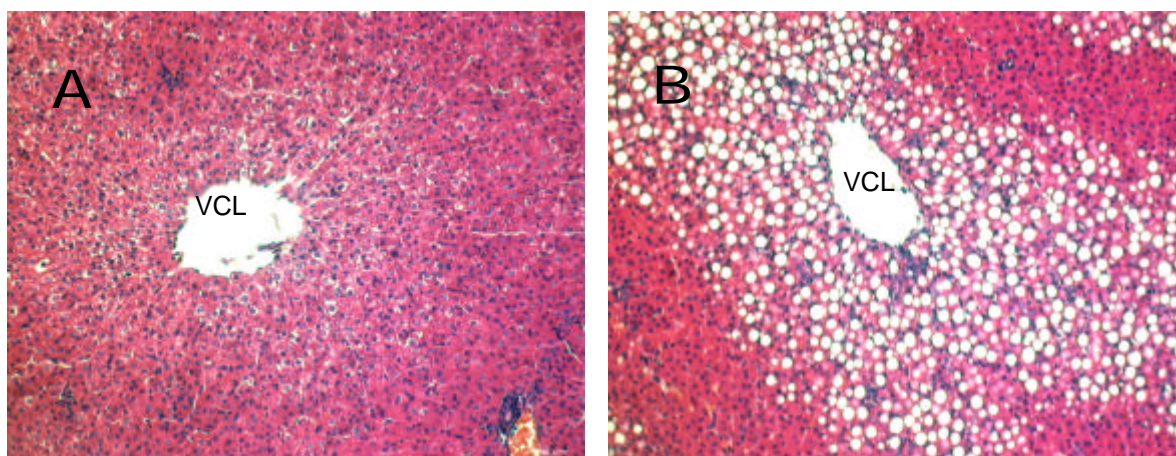
R = rutina

NR = naringina/rutina



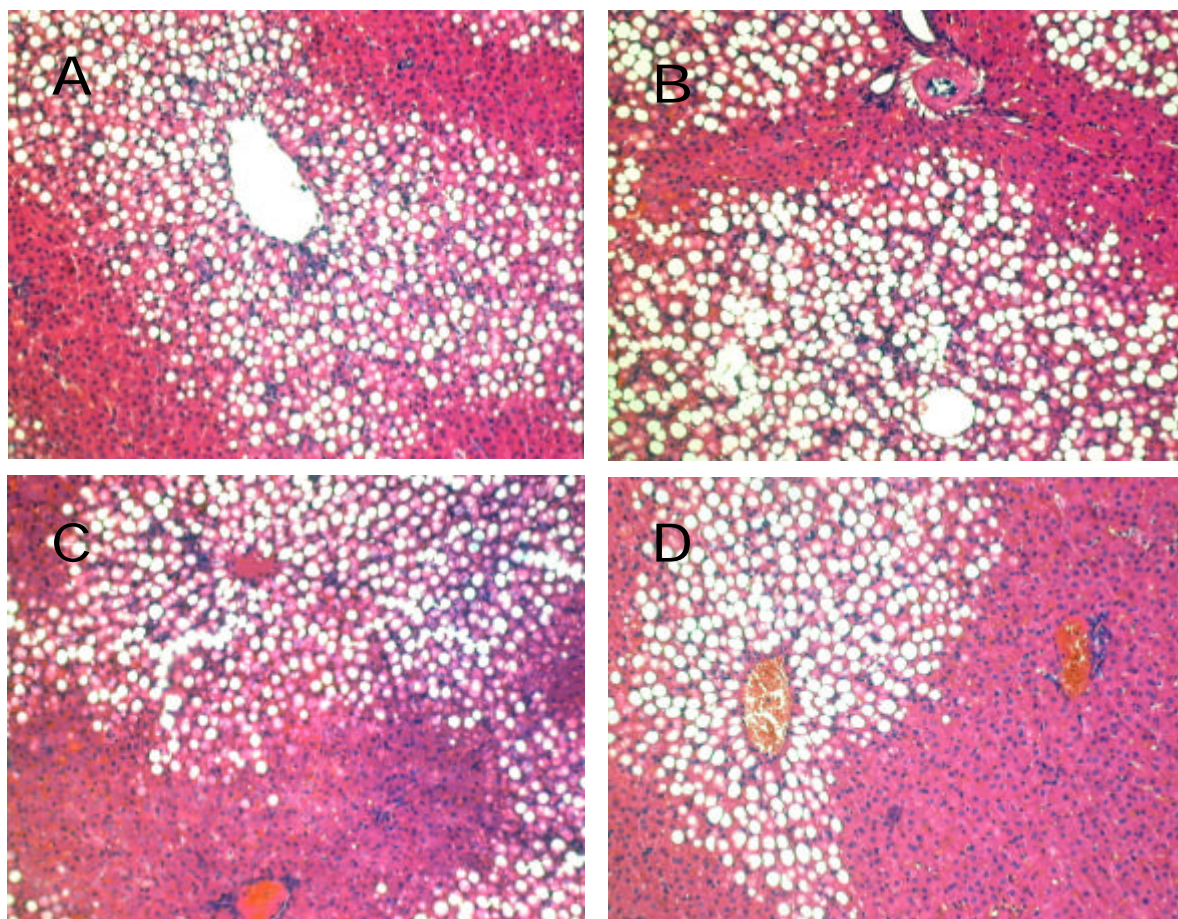
### 3.2 – Análises histopatológicas

Na Figura 1, são apresentados cortes de tecido hepático de cobaias pertencentes ao grupo testemunha, que recebeu somente ração e água (1 A) e do grupo controle, que recebeu suplementação de colesterol e ácido cólico (1 B). Observam-se vacúolos de forma acentuada, no citoplasma dos hepatócitos (degeneração gordurosa), com distribuição centrolobular, para o grupo suplementado com colesterol, que pode ser caracterizada como esteatose hepática (Figura 1 B). No grupo testemunha, não foram observadas estas alterações histopatológicas (Figura 1 A).



**Figura 1** – Histologia do fígado de cobaias após seis semanas de experimentação. **A**, grupo testemunha (grupo 1) sem alterações histológicas. **B**, grupo controle (grupo 2), com distribuição centroglobular da degeneração gordurosa acentuada dos hepatócitos. VCL: veia centro lobular. HE. (70X)

Na análise dos grupos tratados com flavonóides não foram observadas diferenças histopatológicas significativas em relação ao grupo controle, 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 centrolobular, enquanto que os grupos tratados apresentaram uma distribuição centrolobular e em direção a periferia do lóbulo (Figura 2).



**Figura 2.** Histologia do fígado de cobaias após seis semanas de experimentação. **A**, grupo 2 (0,4% de colesterol e 1% de ácido cólico). **B**, grupo 3 (0,4% de colesterol + 1 % de ácido cólico + 30mg de naringina). **C**, grupo 4 (0,4% de colesterol + 1 % de ácido cólico + 30mg de rutina). **D**, grupo 5 (0,4% de colesterol + 1 % de ácido cólico + 15mg de naringina e 15mg de rutina). (70X). HE.

Os cortes da parede do arco aórtico dos animais tratados não apresentaram alteração histológica, quando comparados com o grupo testemunha.

#### 4 - DISCUSSÃO

A homeostase do colesterol é muito importante para a prevenção de doenças cardiovasculares. Geralmente, as concentrações plasmáticas são reguladas pela biossíntese de colesterol, remoção do colesterol circulante, absorção do colesterol da dieta e de sua excreção pela bile e fezes (LEE et al., 2003).

As duas enzimas que estão diretamente envolvidas na regulação do metabolismo do colesterol são: a 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima limitante na via da biossíntese do colesterol, e a acil coenzima A colesterol aciltransferase (ACAT), uma enzima que esterifica o colesterol nos tecidos incluindo o fígado e o intestino delgado, contribuindo com a secreção hepática de VLDL. Assim sendo, a redução da síntese de colesterol pela inibição da HMG-CoA redutase reduzirá o colesterol plasmático e uma redução na atividade da ACAT poderá diminuir a secreção de VLDL no fígado (CARR et al., 1992), isto poderá contribuir com uma menor incidência de doenças cardiovasculares devido à presença reduzida do colesterol esterificado nas lesões ateroscleróticas (HELGERUD et al., 1981; BROWN e GOLDSTEIN, 1986; ENDO, 1992).

Flavonóides derivados de frutas cítricas exercem diversas funções biológicas, incluindo efeitos preventivos e terapêuticos para várias doenças. Entre eles, hesperidina, hesperetina, naringenina e naringina melhoraram o metabolismo do colesterol em animais com hipercolesterolemia induzida através da dieta (MONFORTE et al., 1995; BOK et al., 1999).

Os resultados obtidos neste experimento, demonstraram uma redução considerável nas concentrações sanguíneas de colesterol total e LDL-colesterol (Tabelas 3 e 4), tanto pelo efeito dos flavonóide rutina e naringina, como da sua associação, naringina + rutina. Além disso, também houve uma pequena redução de VLDL-colesterol, triacilgliceróis e glicose (Tabelas 1, 2 e 6). Durante o experimento houve perda total dos animais do grupo 6, que foi tratado com uma dose diária de 10mg de atorvastatina, devido a isso sugere-se que a dose utilizada nesse modelo seja melhor investigada para estudos futuros.

As concentrações de colesterol total no plasma demonstraram uma redução para todos os grupos que receberam flavonóides, quando comparados com o grupo controle (Tabela 3). Porém, a naringina reduziu os valores de colesterol em 38,38%,

ao passo que rutina e a associação naringina + rutina reduziram em 30,53% e 33,77%, respectivamente. Os mecanismos de ação dos flavonóides sobre a homeostase do colesterol foram evidenciados por WILCOX et al (2001). Esses autores atribuíram aos flavonóides cítricos naringenina e hesperetina efeito na redução do colesterol plasmático, através da inibição da atividade da ACAT, reduzindo a secreção de apoB e síntese de novo de colesterol esterificado. Outros autores também observaram que flavonóides inibiram a enzima limitante da biossíntese de colesterol HMG-CoA redutase, resultando em reduções significativas dos níveis plasmáticos de colesterol (BOK et al., 1999; BOK et al., 2000; ANILA e VIJAYALAKSHMI, 2002; LEE et al., 2003). No entanto, ainda não está claro se todos os flavonóides derivados naturais exercem estas propriedades.

Neste estudo verificou-se redução para o colesterol-LDL em todos os tratamentos, principalmente por meio da naringina, que atingiu 50,56% (Tabela 4). Este resultado é importante, uma vez que as concentrações elevadas de LDL podem sofrer modificações oxidativas e contribuir com a formação das células espumosas, ricas em colesterol, que caracterizam as lesões ateroscleróticas (NATAN et al., 1997). KIRK et al. (1998) registraram um mecanismo de ação onde os flavonóides são capazes de ativar os receptores de LDL hepáticos, contribuindo com a redução de LDL no plasma. Outra hipótese sobre este efeito pode ser atribuída a inibição da ACAT, que conseqüentemente poderá reduzir o colesterol esterificado no fígado, a secreção de apoB e VLDL, possibilitando redução das concentrações plasmáticas de LDL. Segundo BURNETT et al. (1999), a inibição da ACAT diminui a produção de apoB, VLDL e LDL. Considerando esta afirmação, os valores de VLDL em nosso estudo também encontram-se reduzidos, principalmente para o grupo tratado com naringina + rutina (Tabela 6). Em adição, WILCOX et al. (2001) relataram uma diminuição na disponibilidade de lipídios para a reconstituição de lipoproteínas contendo apoB pela redução da atividade da ACAT juntamente com o aumento da expressão dos receptores de LDL e uma inibição da atividade da proteína microsomal de transferência de triacilgliceróis (MTP), através dos flavonóides naringenina e hesperetina. A MTP é considerada essencial para a reconstituição e secreção hepática de lipoproteínas contendo apoB, como VLDL e LDL (WETTERAU et al., 1998; JAMIL et al., 1995).

Além das propriedades redutoras da LDL no plasma, diversos estudos com animais, humanos e *in vitro* mostram que os flavonóides previnem as modificações desta lipoproteína, diminuindo assim suas propriedades aterogênicas (FUHRMAN et al., 2002; AVIRAM et al., 2000; Silva et al., 2000; AVIRAM e FUHRMAN, 1998; LIM, et al., 1998; SILVA et al., 1997).

A redução do colesterol-HDL em 15,15% e 14,30% para naringina e a associação naringina + rutina encontrada neste estudo foi um resultado desfavorável, pois esta lipoproteína é responsável pelo transporte reverso do colesterol, o que lhe confere propriedades anti-aterogênicas. Pesquisas anteriores que utilizaram mistura de flavonóides cítricos e extratos de casca cítricos, bem como éter 7-O-cetílico da naringenina, em ratos alimentados com doses elevadas de colesterol, observaram um ligeiro aumento nas concentrações de HDL, comparados ao grupo controle (BOK et al., 1999; LEE et al., 2003). Em outros estudos com flavonóides em coelhos e ratos os níveis de HDL permaneceram inalterados (KIRK et al., 1998; ANILA e VIJAYALAKSHMI, 2001; LEE et al., 2001). Esses estudos utilizaram modelos que apresentam diferenças metabólicas em relação ao perfil lipídico de cobaias, as quais possuem maiores concentrações plasmáticas da LDL e menores concentrações da HDL, enquanto ratos atingem a maioria do colesterol na fração da HDL e coelhos da VLDL (FERNANDEZ, 2001; MOHAMED et al., 2001; FERNANDEZ et al., 1999).

Observou-se uma redução de apenas 12,85% nos níveis de glicose do grupo tratado com rutina (Tabela 1). Ainda que não seja estatisticamente significativa, uma possível explicação relatada pela literatura seria que os flavonóides são capazes de se ligar a receptores de insulina. Conforme a hipótese descrita por ALBERTS et al. (1997) sobre os efeitos dos flavonóides, a regulação da secreção de insulina seria a ativação da proteína quinase e por meio do acúmulo do AMPc no citosol, esta enzima ativaria uma cascata de fosforilações culminando com a transcrição de genes específicos para a insulina. Outro mecanismo de regulação da secreção de insulina envolvendo tirosinas quinases também foi observado. O flavonóide genisteína, um potente inibidor de tirosina quinase aumentou a liberação de insulina. SORENSON et al., (1994), DRAKE e POSNER (1998), sugerem que as proteínas tirosinas fosfatases, mais que as proteínas tirosinas quinases mostram ação ativadora daquelas proteínas, estimulando a secreção de insulina.

Pesquisas têm demonstrado ações de flavonóides sobre carboidratos. A ligação de proteínas, lipídios e DNA a carboidratos poderá resultar em alterações estruturais chamadas de produtos finais de glicação avançada (AGE). Os danos por AGE podem contribuir para a patologia da catarata, desordens renais, aterosclerose, desordens cardíacas e doença de Alzheimer. Os receptores de AGE (RAGE) estão presentes em células endoteliais do sistema vascular e em fagócitos mononucleares e mediam a remoção do AGE. Em muitas reações imunes, a remoção de AGE mediada pelos receptores poderá resultar em danos. Nas células endoteliais a oxidação e expressão de moléculas de adesão VCAM-1 poderão aumentar como um resultado da ligação dos RAGE (MONIER et al., 1992, WELLS-KNECHT et al., 1995)

A autooxidação de carboidratos, a ligação covalente de um carboidrato a um grupo amino livre (glicação) e a oxidação de glicatos (glicooxidação) são os passos na rota de formação da AGE sujeitos a inibição. A autooxidação produz espécies reativas de oxigênio como  $H_2O_2$ , assim como, a glicooxidação, que é um rearranjo oxidativo de glicatos, poderá resultar na formação de AGE e espécies reativas de oxigênio. Diversas classes de flavonóides inibem a autooxidação de glicose. Flavonóides com grupo hidroxila no anel B como quercetina, são eficientes inibidores da glicação de colágeno, ao passo que flavonóides sem esse grupo hidroxila como naringina não apresentam o mesmo efeito, pois compostos com grupo hidroxila podem formar quinonas e a inibição da glicação poderá resultar na ligação de grupos amina pelos flavonóides. Alguns flavonóides inibem a autooxidação e a glicooxidação de glicose (SCHRAMM et al., 1998).

Uma redução fisiologicamente considerável nos valores de triacilgliceróis obtidos pelos flavonóides rutina (16,00%) e rutina + naringina (24,29%), conforme Tabela 2, podem ser justificados por seus mecanismos de ação investigados através de estudos. Pesquisas indicam que a ação estrogênica dos flavonóides é um mecanismo importante para explicar seus efeitos sobre o metabolismo lipídico e prevenção da aterosclerose. Em coelhos, ratos e aves, verificou-se que flavonóides como quercetina, genisteína, isoliquiritigenina e apigenina, podem se ligar a receptores de estrogênio do tipo II (MIKSICEK, 1993). Além disso, observou-se que eles são capazes de aumentar a atividade da lipase pancreática, enzima que hidrolisa os triacilgliceróis (LIMA et al., 1999).

Neste estudo, os animais não apresentaram alterações nas artérias analisadas, provavelmente devido ao período de duração do experimento. Segundo COS et al. (2000), cobaias apresentaram acúmulo de fibras gordurosas e desenvolvimento aterosclerótico inicial nas artérias após 12 semanas de dieta hipercolesterolêmica, sendo que este teve a duração de seis semanas.

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, utilização e secreção de VLDL geram um acúmulo de triacilgliceróis e ésteres de colesterol nos hepatócitos que podem levar à esteatose hepática (STUDENIK, 2000). Isto foi constatado em nosso estudo, ao avaliarmos o tecido hepático do grupo controle, que recebeu suplementação de colesterol bem como dos grupos que além da suplementação do colesterol foram tratados com flavonóides.

A fisiopatologia da esteatose hepática ainda não é bem compreendida. Porém, a redução da formação de VLDL, principal rota de exportação de lipídios hepáticos, que é determinada pela síntese de apoB-100 pode ser um fator importante no desenvolvimento da esteatose (CHARLTON et al., 2002). Segundo LONARDO (1999), esta alteração hepática geralmente é manifestada por alterações do metabolismo da glicose, hiperlipemia e hipertensão.

Recentemente, BJÖRKGREN et al. (2002) desenvolveram um estudo com camundongos com ausência da MTP no fígado. Eles observaram que a secreção de VLDL foi quase completamente bloqueada e esteve acompanhada de uma esteatose hepática moderada, mas com os camundongos aparentemente saudáveis.

Pesquisas atuais também têm demonstrado um forte envolvimento da apoE na regulação da secreção de VLDL em nível hepático (KUIPERS et al., 1997; MENSENKAMP et al., 1999; HUANG et al., 1999; MAUGEAIS et al., 2000). Segundo estudo realizado por MENSENKAMP et al. (2001), camundongos deficientes em apoE desenvolveram esteatose hepática e mostraram redução na secreção de VLDL.

De acordo com os resultados em nosso estudo, os fatores envolvidos no desenvolvimento da esteatose deverão ser melhor investigados, posteriormente, pois segundo REIHNER et al. (1990), cobaias sintetizam e catabolizam taxas moderadas de colesterol hepático. Além do mais, os flavonóides atuam em alguns

fatores essenciais para a secreção hepática da VLDL, como inibição da ACAT, redução da produção de apoB e inibição da MTP (WILCOX et al., 2001; BURNETT et al., 1999). Outra investigação futura deverá ser efetuada em relação a utilização do ácido cólico na indução da hiperlipemia, que poderá inibir a atividade da enzima 7- $\alpha$ -hidroxilase, responsável pela eliminação do excesso de colesterol por meio da conversão do colesterol em ácidos biliares (FERNANDEZ, 2001). Em vista disso, poderá aumentar a deposição de gordura nas células hepáticas.

## **5 - CONCLUSÕES**

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que os flavonóides naringina e rutina apresentaram propriedades hipolipemiantes no metabolismo lipídico em cobaias. Apesar dos resultados não demonstrarem diferenças estatisticamente significantes as reduções de colesterol foram fisiologicamente importantes, apresentando um significado clínico, principalmente por serem baseadas na fração de colesterol-LDL, pois concentrações plasmáticas elevadas dessa lipoproteína demonstram um grande fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Das substâncias estudadas, naringina apresentou melhores resultados na redução das concentrações de colesterol total e colesterol-LDL. A associação naringina + rutina apresentou melhores resultados na redução das concentrações de colesterol-VLDL e triacilgliceróis. Rutina demonstrou-se eficiente na redução de glicose e na manutenção de colesterol-HDL.

Os resultados sugerem que a utilização destas substâncias pode ser benéfica na prevenção das doenças que acometem o aparelho cardiovascular. No entanto, outros estudos são necessários para avaliar os mecanismos de ação bem como os efeitos toxicológicos destas substâncias nesta espécie, a longo prazo, devido às similaridades deste modelo animal no metabolismo do colesterol e das lipoproteínas em humanos.



## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERST, B., BRAY, D., LEWIS, J. et al. *Biologia molecular da célula*. 3ª ed. Porto Alegre: **Artes Médicas**. 1294p, 1997.
- ALLAIN, C.C., POON, L.S., CHAN, C.S. et al. Enzymatic determination of total cholesterol. **Clinical Chemistry**. 20:470-475, 1974.
- ANILA, L., VIJAYALAKSHMI, N.R. Flavonoids from *Embilica officinalis* and *Mangifera indica* – effectiveness for dyslipidemia. **J. of Ethnopharmacology**. 79:81-87, 2002.
- ASSMAN, G., SCHRIEWER, H., SCHMITZ, G. et al. Quantification of high-density-lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid/MgCl<sub>2</sub>. **Clinical Chemistry**. 29:2026-2030, 1983.
- AVIRAM, M., FUHRMAN, B. Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. **Atherosclerosis**. 137:S45-S50, 1998.
- AVIRAM, M., DORNFELD, L., ROSENBLAT, M. et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenesis modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. **Am. J. Clin. Nutr.** 71:1062-1076, 2000.
- BJÖRKEGREN, J., BEIGNEUX, A., BERGO, M.O. et al. Blocking the secretion of hepatic very low density lipoproteins renders the liver more susceptible to toxin-induced injury. **J. Biol. Chem.** 277:5476-5483, 2002.
- BONDAR, R.J.L., MEAD, D.C. Evaluation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* in the hexokinase method for determining glucose in serum. **Clinical Chemistry**. 20:586-590, 1974.
- BURNETT, J.R., WILCOX, L.J., TELFORD, D.E. et al. Inhibition of ACAT by avasimibe decreases both VLDL and LDL apolipoprotein B production in miniature pigs. **J. Lipid Res.** 40:1317-1327, 1999.
- BOK, S.H.; LEE, S.H.; PARK, Y.B., et al. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl-CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. **J. Nutrition**. 129:1182-1185, 1999.
- BOK, S.H., SHIN, Y.W., BAE, K.H. et al. Effects of naringin and lovastatin on plasma and hepatic lipids in high-fat and high-cholesterol fed rats. **Nutr. Res.** 20:1007-1015, 2000.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**. 232:34-47, 1986.

CARR, T.P., PARKS, J.S., RUDEL, L.L. Hepatic ACAT activity in african green monkeys in highly correlated to plasma LDL cholesterol enrichment and coronary artery atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb.** 12:1274-1283, 1992.

CHARLTON, M., SREEKUMAR, R.K., RASMUSSEN, D. et al. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology.** 35:898-904, 2002.

COS, E.B., ROY, S., YOGANTHAN, S. Et al. Dietary soluble fiber and soybean protein reduce fatty streak accumulation in male, female and ovariectomized guinea pigs. **FASEB J.** 14:A353-A357, 2000.

COOK, N.C., SAMMAN, S. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. **J. Nutr. Biochem.** 7:66-76, 1996.

DRAKE, P.G., POSNER, B.I. Insulin receptor-associated protein tyrosine phosphatase (s): role in insulin action. **Molecular and Cellular Biochemistry.** 182:79-89, 1998.

ENDO A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **J. Lipid. Res.** 33:1569-1582, 1992.

FERNANDEZ, M. L.; WILSON, T. A.; CONDE, K. et al. Hamsters and guinea pigs differ in their plasma lipoprotein cholesterol distribution when fed diets varying in animal protein, soluble fiber and cholesterol content. **J. Nutr.** 129:1323-1332, 1999.

FERNANDEZ, M. L. Guinea pigs as models for cholesterol and lipoprotein metabolism. **J. Nutr.** 131:10-20, 2001.

FOSSATI, P., PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry.** 28:2077-2080, 1982.

FUHRMAN, B., AVIRAM, M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. **Curr. Opin. Lipidol.** 12:41-48, 2001.

FUHRMAN, B.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; et al. Antiatherosclerotic effects of licorice extract supplementation on hypercholesterolemic patients: increased resistance of LDL to atherogenic modifications, reduced plasma lipid levels and decreased systolic blood pressure. **Nutrition.** 18:268-273, 2002.

GRUNDY, S.M., DENKE, M.A. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. **J. Lipids Res.** 31:1149-1172, 1990.

HEGSTED, D.M., AUSMAN, L.M., JOHNSON, J.A., DALLAL, G.E. Dietary fat and serum lipids: An evaluation of the experimental data. **Am. J. Clin. Nutr.** 57:875-883, 1993.

HELGERUD P., SAAREM, K., NORUM, K.R. Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in human small intestine: its activity and some properties of the enzyme reaction. **J. Lipids Res.** 22:271-277, 1981.

HERTOG, M.G.; FESKENS, E.J.; HOLLMAN, P.C. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Ederly Study. **Lancet**.342:1007-1011, 1993.

HUANG, Y.Ji. Z.S., BRECHT, W.J., RALL, S.C.Jr. et al. Overexpression of apolipoprotein E3 in transgenic rabbits causes combined hyperlipidemia by stimulating hepatic VLDL production and impairing VLDL lipolysis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 19:2952-2959, 1999.

JAMIL, H.J.K., DICKSON, Jr.C., CHU, M.W. et al. Microsomal triglyceride transfer protein: specificity of lipid binding and transport. **J. Biol. Chem.** 270:6549-6554, 1995.

KIRK, E. A., SUTHERLAND, P.; WANG, S. A. et al. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in c57bl/6 mice but not LDL receptor deficient mice. **J. Nutr.** 128:954-959,1998.

KUIPERS, F., LIN, Y., HAVINGA, R., BLOKS, V. et al. Impaired production of very low density lipid proteins by apolipoprotein E-deficient mouse hepatocytes in primary culture. **J. Clin. Invest.** 100:2915-2922, 1997.

LEE, C.H.; JEONG, T.S.; CHOI, Y.K., et al. Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits. **Biochem. and Biophys Res Communic.** 284:681-688, 2001.

LEE, M.K., MOON, S.S, LEE,S.E. et al. Naringenin 7-O-cetyl ether as inhibitor of HMG – CoA reductase and modulator of plasma and hepatic lipids in high cholesterol – fed rats. **Bioorganic & Med. Chem.** 11:393-398, 2003.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; OLIVEIRA, M. G. A. et al. Determinação da atividade de lipase na presença de morina, naringenina, naringina e rutina. **Ciência Agrotécnica Lavras.** 23:626-631, 1999.

COSTA, N.M.B. Investigations into the cholesterol-lowering property. of baked beans. Universty of Reading Ph.D. Thesis, 1992,

LIM, B.; YU, B.P.; CHO, S.I., et al. The inhibition by quercetin and ganhuangenin on oxidatively modified low density lipoprotein. **Phytother. Res.** 12:340-345, 1998.

LIN, E.C.K., FERNANDEZ, M.L., McNAMARA, D.J. High density lipoprotein metabolism is altered by dietary cholesterol but not fat saturation in guinea pigs. **Atherosclerosis.** 112: 161-175, 1995.

LONARDO, A. Fatty liver na nonacoholic steatohepatitis. Where do we stand and where are we going? **Med and Gastroent.** 17:80-89, 1999.

MAUGEAIS, C., TIETGE, U.J.F., TSUKAMOTO, K. et al. Hepatic apolipoprotein E expressim promotes very low density lipoprotein-apolipoprotein B production in vivo in mice. **J. Lipid. Res.** 41:1673-1979. 2000.

MENSENKAMP, A.R., JONG, M.C., VAN GOOR, H. et al. Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density lipoprotein-triglyceride secretion by the liver. **J. Biol. Chem.** 274:35711-35718, 1999.

MIDDLETON, E.J. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Adv. Exp. Med. Biol.** 439:175-182, 1998.

MIKSICEK, R. J. Commonly occurring plant flavonoids, have estrogenic activity. **Mol. Pharm.** 44:37-43, 1993.

MERCKEM, H.M., BEECHER, G.R. Measurementof food flavonoids by hight performance liquid chromatography: a review. **J. of Agric. Food Chem.** 48:577-599, 2000.

MONFORTE, M.T., TROVATO, A., KIRJAVAINEN, S. et al. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoi: hipolipidemic activity on experimental hipercholesterolemia in rat. **Pharmacology.** 50:595-599, 1995.

MONIER, V. M.; SELL, D. R.; NAGARAJ, R.H. et al. Maillard reaction mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia. **Diabetes.** 4:36-41,1992.

NATAN, T.; CHAUDRI, G. Estrogens and atherosclerosis. Annual Review **Pharmacology Toxicology.** 37:477-552, 1997.

PENA, N.C., MELGAREJO, S. J.A., MÉNDEZ, J.D. Aterosclerosis experimental. Cambios bioquimicos e vasculares. **Rev. Med. IMSS.** 37:401-406, 1999.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutr Res.** 18:1995-2018, 1998.

QUINTÃO, E.C.R. Colesterol e aterosclerose. Rio de Janeiro. **Qualitymark,** 1992. 276p.

REIHNER, E., ANGELIN, B. RUDLING, M. et al. Regulation of hepatic cholesterol metabolism in humans: Stimulatory effects of cholestyramine on HMGoCoA redutase activity and low density lipoprotein receptor expression in gallstone patients. **J. lipid. Res.** 31:2219-2226.

RIBEIRO Jr., J.I. Análises estatísticas no SAEG. Ed. **Folha de Viçosa,** Viçosa MG, 2001,310p.

SILVA, E.L., ABDALLA, D.S., TERAQ, J. Inibitorry effect of flavonoids on low-density lipoprotein peroxidation catalyzed by mammalian 15-lipoxygenase. **IUBMB Life.** 49:289-295, 2000.

SILVA, E.L., TSUSHIDA T., TERAQ, J. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. **Arch. Biochem. Biophys.** 349:313-320, 1997.

SCHRAMM, D.D., DONOVAN, J.L., KELLY, P.A. et al. Differential effects of small and large molecular weight wine phytochemicals on endothelial cell eicosanoid release. **J. Agric. Food Chem.** 46:1901-1905, 1998.

SORENSEN, R.L., BRELJE, T.C., ROTH, C. Effect of tyrosine kinase inhibitors on insulin secretion: evidence for tyrosine kinases in the regulation of insulin secretion. **Diabetes** 43:1975-1978, 1994.

STUDENIK, P. Lipid disorders in liver diseases. **Vnitr. Lek.** 46:547-8, 2000.

VAN, T. A., VAN, G. A., SCHEEK, L. M. Lipoprotein structure and metabolism during progression and regression of atherosclerosis in pigs fed with fish oil-derived fatty acid. **Adv. Exp. Med. Biol.** 285:417-421, 1991.

VERHAMME, P., QUARCK, R. HAO, H. et al. Dietary cholesterol withdrawal reduces vascular inflammation and induces coronary plaque stabilization in miniature pigs. **Cardiovas. Res.** 56:135-144, 2002.

WELLS-KNECHT, K.J.; ZYZAK, D.V.; LINCHFIELD, J. E. et al. Mechanism of autoxidative glycosylation identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. **Biochemistry.** 34:15314-1514, 1995.

WETTERAU, J.R., GREGG, R.E., HARRITY, T.W. et al. An MTP inhibitor that normalizes atherogenic lipoprotein levels in WHHL rabbits. **Science.** 282:751-754, 1998.

WILCOX, L.J., BORRADAILE, N.M., DREU, L.E. et al. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. **J. Lipid. Res.** 42:725-734, 2001.

XU, R.; YOKOYAMA, W.H.; IRVING, D.; et al. Effect of dietary catechin and vitamin E on aortic fatty streak accumulation in hypercholesterolemic hamsters. **Atherosclerosis.** 137:29-36, 1998.

### **ARTIGO 3 - EFEITOS DOS FLAVONÓIDES NARINGINA E RUTINA NO METABOLISMO LIPÍDICO EM GALINHAS POEDEIRAS (*Lohmann branca*)**

#### **RESUMO**

LUFT, Nair, M.Sc. OLIVEIRA, Tânia Toledo. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2003. **Efeitos dos flavonóides naringina e rutina no metabolismo lipídico em galinhas poedeiras (*Lohmann branca*)**

Este estudo foi realizado para testar os efeitos dos flavonóides, rutina e naringina, na redução das concentrações de lipídios plasmáticos e investigar a histopatologia dos tecidos hepáticos e arteriais em galinhas poedeiras. A hiperlipidemia foi induzida com 1% de colesterol na ração. Foram utilizadas 36 aves divididas em 6 grupos (n=6). O grupo 1 (testemunha) recebeu somente ração, o grupo 2 (controle) recebeu ração com colesterol. Três grupos receberam ração com colesterol + flavonóide: 30mg de naringina ou 30 mg de rutina ou 15mg de naringina + 15 mg de rutina. O sexto grupo recebeu ração com colesterol + 10 mg de atorvastatina. As dosagens sanguíneas foram efetuadas em 3 tempos: no início do experimento, após 21 e 42 dias de tratamento. De acordo com os resultados obtidos, após 21 dias de tratamento a naringina (46,63%; 43,63%) apresentou uma eficiência maior na redução dos níveis de colesterol total e colesterol-não-HDL, respectivamente. Aos 42 dias rutina (41,37%; 48,10%) demonstrou uma redução superior para estes dois parâmetros, respectivamente. Após 42 dias de tratamento, observou-se uma grande redução das concentrações de colesterol-HDL em todos os grupos, e essa redução foi maior para os grupos que receberam rutina (34,84%) e rutina + naringina (34,62%). A atorvastatina utilizada como referência padrão demonstrou eficiência na redução do colesterol em todos os tempos, inclusive na redução do colesterol-HDL. Nas investigações histopatológicas, nenhuma alteração foi detectada nas artérias. Porém, observou-se deposição de gordura hepática no grupo controle e no grupo tratado com a associação dos flavonóides naringina + rutina. Os resultados indicam que os flavonóides apresentam propriedades hipolipemiantes e sua utilização proporciona efeitos benéficos na prevenção das doenças cardiovasculares.

## ABSTRACT

LUFT, Nair, M.Sc. OLIVEIRA, Tânia Toledo. Universidade Federal de Viçosa, July, 2003. **Effects of the narigin and rutin flavonoids in the lipid metabolism of the laying hens (*White Lohmann*)**

This study was accomplished to test the effects of the flavonoids, rutin and narigin in the reduction of the concentrations of plasmatic lipids and to investigate the histopathology of the hepatic and arterial tissues in laying hens. The hiperlipidemy was induced with 1 % of cholesterol in the ration. Thirty -six birds divided in six groups were used (n = 6). The group 1 (witness) received only ration, the group 2 (control) received ration with cholesterol. Three groups received ration with cholesterol, besides the flavonoid, 30 mg of narigin or 30 mg of rutin or 15 mg of narigin + 15 mg of rutin. The sixth group received ration with cholesterol + 10 mg of athorvastatin. The sanguine dosages were made in three times: in the beginning of the experiment, after 21 and 42 days of tratment. According to the obtained results after 21 days of treatment the narigin (43,63%; 49,57%) presented a larger efficiency in the reduction of the levels of total cholesterol and no HDL-cholesterol, and to the 42 days, rutin (48,10%; 49,73%) demonstrated a superior reduction for these two parameters. After 42 days of treatment, a great reduction of concentrations of cholesterol was observed in all the groups, and that reduction was larger for the groups that received rutin (34,84%) and rutin + narigin (34,62%). The athorvastatin used as a standard reference, demonstrated efficiency in the reduction of the cholesterol in all the times, including in the reduction of the cholesterol-HDL. In the histopathologica investigations, no alteration was detected in the arteries. Even so, deposition of hepatic fat was observed in the control group and in the group treated with the association of the flavonoids narigin + rutin. The results suggest that the flavonoids present hipolipemiant properties, and their use indicates beneficial effects in the prevention of the cardiovascular diseases.

## 1 - INTRODUÇÃO

Dados epidemiológicos indicam que as doenças do aparelho cardiovascular são consideradas a primeira causa de morte entre indivíduos maiores de 20 anos, representando importante problema de saúde pública no Brasil e na maior parte dos países desenvolvidos. As doenças cardiovasculares incluem as doenças coronarianas, cérebro-vasculares e vasculares periféricas, consideradas a expressão clínica da aterosclerose avançada.

Estudos têm demonstrado uma relação direta entre as desordens do metabolismo lipídico e o surgimento das doenças cardiovasculares (VOYIAZAKIS et al., 1998; PAN et al., 1995). As hipercolesterolemias constituem importante fator de risco para o aparecimento precoce destas doenças, assim como hipertensão, tabagismo, e diabetes mellitus (SHAEFER, 2002).

As concentrações elevadas de LDL e suas modificações como retenção, oxidação e agregação são consideradas um dos maiores fatores de risco para a aterosclerose. Uma das modificações mais significantes para a formação inicial da lesão é a oxidação lipídica do LDL, que passa a ser facilmente reconhecido pelos receptores “*scavengers*” dos macrófagos, levando à formação de células espumosas (WILLIAMS e TABAS, 1995; BERLINER et al, 1995).

A associação da aterosclerose com eventos oxidativos tem suportado a hipótese da capacidade dos antioxidantes da dieta em inibirem o desenvolvimento da aterosclerose e reduzirem a incidência das doenças cardiovasculares (XU et al, 1998). Estudos clínicos e epidemiológicos atribuem propriedades cardioprotetoras aos flavonóides, e revelam uma relação inversa entre o seu consumo e estas doenças (HERTOG et al, 1993). Isto pode estar relacionado a diversos fatores como, a capacidade em reduzir a oxidação do LDL, através da peroxidação lipídica, quebração da transição de íons metais e remoção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (FUHRMAN e AVIRAM, 2001). Desta forma, poderá haver a prevenção do estágio precoce da aterogênese, que é caracterizado pelo acúmulo de macrófagos envolvendo resíduos de LDL e colesterol no espaço subendotelial do vaso (SCHARTZ et al., 1991). Entre estas e outras propriedades como a capacidade de reduzir os níveis de colesterol no plasma (FUHRMAN et al., 2002), os flavonóides



são considerados protetores das células arteriais, atenuando significativamente o desenvolvimento da aterosclerose (FUHRMAN et al., 2001).

Tendo em vista estes aspectos, diversos estudos experimentais têm sido desenvolvidos em espécies animais para avaliar os efeitos dos flavonóides sobre esta patologia. Porém, poucos estudos, avaliando estes efeitos, são realizados com aves. Segundo SILVA (2001), frangos de corte apresentaram indução efetiva de hiperlipemia através da suplementação de colesterol na dieta e os flavonóides rutina e naringina demonstraram redução significativa das concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-VLDL e triacilgliceróis, sem causar alterações nos níveis de colesterol-HDL.

O metabolismo lipídico de galinhas poedeiras apresenta muitas diferenças em relação a outras espécies. A maioria do colesterol plasmático desta espécie está na forma de VLDL, ao passo que, em humanos normolipidêmicos, hamsters, coelhos, ratos, cobaias e cães, LDL e HDL são os principais transportadores do colesterol (ELKIN et al., 1999). Além disso, a maior rota de excreção do colesterol em galinhas ocorre através da gema do ovo (NABER, 1983).

A regulação da síntese e secreção hepática de lipoproteínas em aves não está bem definida. Segundo TARLOW et al. (1977), as condições hormonais exercem um efeito muito importante nesta regulação, pois hepatócitos em galinhas demonstraram que a insulina intensifica ambos a lipogênese de novo e síntese de VLDL, enquanto tiroxina e glucagon exercem um efeito oposto.

O presente trabalho propõe esclarecimento dos efeitos dos flavonóides naringina e rutina no metabolismo lipídico em galinhas poedeiras.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

O ensaio biológico foi realizado no aviário do Departamento de Zootecnia, a análise dos parâmetros sanguíneos foi realizada no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e, a análise histológica foi realizada no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

## 2.1 - Ensaio biológico

Neste estudo experimental foram utilizadas 36 aves (*Lohmann branca*), procedentes do aviário da Universidade Federal de Viçosa, com idade média de 72 semanas e peso médio de 1574g. As aves foram distribuídas ao acaso em seis grupos com seis unidades em cada, mantidos em gaiolas individuais com alimentação e água *ad libitum* e submetidas aos tratamentos descritos a seguir. Anteriormente ao período do experimento, todas estavam recebendo apenas água e ração.

O grupo 1 (testemunha) recebeu somente ração básica; o grupo 2 (controle) recebeu ração com 1,0% de colesterol; o grupo 3 recebeu ração com 1,0% de colesterol + 30mg de naringina em forma de cápsulas; o grupo 4 recebeu ração com 1,0% de colesterol + 30mg de rutina em forma de cápsulas; o grupo 5 recebeu ração com 1,0% de colesterol + 15mg de rutina e 15mg da naringina em forma de cápsulas; o grupo 6 recebeu ração com 1,0% de colesterol + 10mg de atorvastatina em forma de comprimidos. O Quadro 1 resume os grupos e os tratamentos aos quais os animais foram submetidos, recebendo uma dose diária das substâncias durante 42 dias.

O peso foi monitorado no tempo zero, 21 e 42 dias.

Quadro 1 – Tratamentos das aves conforme distribuição nos grupos.

<b>GRUPO</b>	<b>TRATAMENTO</b>
G 1	Ração básica
G 2	Ração com colesterol
G 3	Ração com colesterol + naringina
G 4	Ração com colesterol + rutina
G 5	Ração com coleterol + naringina + rutina
G 6	Ração com colesterol + Atorvastatina

## **2.2 - Substâncias Utilizadas**

Para indução da hiperlipemia foi utilizado colesterol cristalino da marca VETEC a 1,0%.

Para testar a redução da hiperlipemia foram utilizados os flavonóides Naringina (N 1376) e Rutina (R 5143) da marca Sigma, isolados e de forma associada.

## **2.3 - Dosagens sanguíneas**

As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca nos tempos 0, 21 dias e 42 dias de tratamento, após jejum de 12 horas, para efetuar dosagens de colesterol total, colesterol-HDL, e triacilglicerol. As mesmas foram centrifugadas em centrífuga Excelsa 2 205 N a 7100 x g, durante 15 minutos para obtenção do soro. As dosagens sorológicas foram efetuadas com equipamento multiparamétrico de Bioquímica (Alizé, Mod Lisabio B.652) e kits da marca BioMérieux, e os resultados expressos em mg/dL. O colesterol não-HDL foi calculado pela subtração dos valores do HDL do colesterol total.

### **2.3.1 - Determinação do colesterol total e triacilglicerol**

Para análise do colesterol total foi utilizado o método enzimático com o kit 61224 da BioMérieux em um comprimento de onda de 500nm, conforme ALLAIN et al. (1974). A dosagem dos níveis de triacilgliceróis séricos foi efetuada por via enzimática, utilizando o kit 61236 da BioMérieux e as leituras de absorbância foram feitas a um comprimento de onda de 505nm, conforme FOSSATI e PRENCIPE (1982).

### **2.3.2 - Determinação do colesterol-HDL**

A dosagem do colesterol-HDL foi realizada pelo método enzimático com o Kit 6153 da BioMérieux, conforme Allain et al. (1974). Esse método baseia-se na

precipitação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) contidas na amostra. Esta precipitação é obtida pela adição de ácido fosfotúngstico em presença de íon magnésio. Antes que o equipamento possa efetuar a leitura do colesterol-HDL, em cada amostra, adiciona-se 50 µl do reativo precipitante (ácido fosfotúngstico e  $MgCl_2 \cdot CH_2O$  pH 6,2) em 500µl de soro. O sobrenadante obtido por centrifugação contém as lipoproteínas de alta densidade (HDL), cujo colesterol é determinado pelo mesmo processo já descrito para a determinação do colesterol total (ASSMAN et al., 1983)

### **2.3.3 - Estimativa de colesterol não-HDL**

Os valores de colesterol não-HDL foram calculados pela diferença entre Colesterol Total e HDL. Onde os valores do HDL foram obtidos previamente conforme mencionado anteriormente.

## **2.4 - Análise histopatológica do fígado e do arco aórtico dos animais**

Após o término dos experimentos, foram coletadas amostras de fígado e arco aórtico das aves, obtendo uma amostra de cada grupo, escolhida ao acaso, a fim de proceder a análise histopatológica, para verificar o acúmulo de gordura hepática, caracterizada patologicamente como esteatose hepática e alteração nas camadas internas da artéria aorta. Estes cortes de tecido foram fixados em formol tamponado 10% por 24-48 horas, passados por álcool 70%, incluídos em parafina e corados pela hematoxilina e eosina. Estas lâminas foram analisadas qualitativamente de acordo com a quantidade de gotículas de gordura depositadas nos tecidos para cada grupo, tendo sido comparadas umas às outras e aos grupos controle.

### **2.4.1 - Confeção das lâminas**

Fragmentos foram coletados e desidratados em álcoois, do 70 ao 95%, passando após pelo álcool absoluto três vezes. Passaram por uma mistura de álcool + xilol e por xilol três vezes. O tempo de permanência em cada solução alcoólica foi de 30 min para os álcoois 70 a 95%, 1 h para cada banho de álcool absoluto, 30 min

para a mistura de álcool + xilol e 50 min para cada banho de xilol. Foram imersos em parafina três vezes e incluídos na terceira solução de parafina de um dia para o outro. O tempo de permanência para cada banho de parafina foi de 1h. No dia seguinte, foram adaptados em suportes de madeira e levados desta forma para o micrótomo rotativo manual (American Optical Company), onde foram cortados e colocados nas lâminas. Procedeu-se o processo de desparafinização e hidratação destes cortes pelo xilol (2 banhos de 10 minutos), álcoois absoluto I II, 95%, 80% e 70% (3 minutos em cada) e água (5 minutos). As lâminas foram coradas com hematoxilina durante 1min e eosina durante 30 segundos, deixados em água corrente e após, montagem, secagem, analisadas ao microscópio Olympus BX 40.

## **2.5 - Análise Estatística**

O experimento foi realizado segundo o delineamento inteiramente casualizado.

Os dados foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA). As médias dos grupos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) e pelo percentual de variação em relação ao grupo controle.

As análises foram efetuadas através do programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas) (RIBEIRO, 2001).

### 3 – RESULTADOS

#### 3.1 – Dosagens sanguíneas e peso

Não houve diferença no peso entre os grupos das aves aos 21 e 42 dias de tratamento (Tabela 1).

Tabela 1 – Médias de peso em gramas de aves submetidas aos tratamentos nos tempos 0, 21 e 42 dias.

Tratamento	0 dia	21 dias	42 dias
G1 – R	1600,00 <sup>a</sup>	1581,67 <sup>a</sup>	1643,33 <sup>a</sup>
G2 – RC	1623,33 <sup>a</sup>	1550,00 <sup>a</sup>	1558,33 <sup>a</sup>
G3 – RCN	1565,00 <sup>a</sup>	1541,67 <sup>a</sup>	1561,67 <sup>a</sup>
G4 – RCR	1551,67 <sup>a</sup>	1533,33 <sup>a</sup>	1565,00 <sup>a</sup>
G5 - RCNR	1426,67 <sup>a</sup>	1480,00 <sup>a</sup>	1545,00 <sup>a</sup>
G6 – RCA	1650,00 <sup>a</sup>	1575,00 <sup>a</sup>	1585,00 <sup>a</sup>

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tuckey ( $p > 0,05$ ).

R = ração básica

RC = ração básica com colesterol

RCN = ração básica com colesterol + naringina

RCR = ração básica com colesterol + rutina

RCNR = ração básica com colesterol + naringina + rutina

RCA = ração básica com colesterol + atorvastatina

Os grupos tratados com rutina (Grupo 4) e atorvastatina (Grupo 6) demonstraram uma redução estatisticamente significativa para as concentrações sanguíneas de triacilgliceróis aos 42 dias, em relação ao grupo controle (Tabela 2). Aos 21 dias constatou-se um percentual de redução de 39,30% e 56,63% para os grupos tratados com naringina e atorvastatina, e aos 42 dias os valores reduziram 32,41%, 47,93% e 58,42% para os grupos que receberam naringina, rutina e atorvastatina, respectivamente. Estes percentuais, mesmo não sendo significativos do ponto de vista estatístico, apresentam um significado clínico importante.

Tabela 2 – Médias de triacilgliceróis (TG) em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle (G2) de galinhas poedeiras submetidas aos tratamentos nos tempos 0, 21 e 42 dias.

Tratamento	0 dia	21 dias		42 Dias	
	TG	TG	% variação	TG	% variação
G1 – R	115,68 <sup>a</sup>	184,24 <sup>a</sup>	-	844,70 <sup>ab</sup>	-
G2 – RC	235,91 <sup>a</sup>	211,81 <sup>a</sup>	-	1129,35 <sup>a</sup>	-
G3 – RCN	183,62 <sup>a</sup>	128,57 <sup>a</sup>	-39,30	763,30 <sup>abc</sup>	-32,41
G4 – RCR	89,75 <sup>a</sup>	170,36 <sup>a</sup>	-19,56	588,07 <sup>bc</sup>	-47,93
G5 – RCNR	57,18 <sup>a</sup>	248,29 <sup>a</sup>	+17,22	1039,42 <sup>a</sup>	-7,96
G6 – RCA	55,01 <sup>a</sup>	91,88 <sup>a</sup>	-56,62	469,56 <sup>c</sup>	-58,42

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tuckey ( $p > 0,05$ ).

R = ração básica

RC = ração básica com colesterol

RCN = ração básica com colesterol + naringina

RCR = ração básica com colesterol + rutina

RCNR = ração básica com colesterol + naringina + rutina

RCA = ração básica com colesterol + atorvastatina

Em relação ao colesterol total (Tabela 3), observou-se uma diferença estatisticamente significativa aos 42 dias de tratamento apenas para o grupo que recebeu atorvastatina (Grupo 6), em comparação com o grupo controle (Grupo 2). Aos 21 dias de tratamento, houve uma redução de 53,09%, 43,63% e 32,49% nas concentrações de colesterol total no plasma para atorvastatina, naringina e rutina respectivamente, demonstrando maior eficiência da atorvastatina. Aos 42 dias observou-se que o grupo tratado com rutina (Grupo 4) apresentou resultado superior aos demais, 48,10% de redução, enquanto que atorvastatina e naringina apresentaram 41,37 e 39,59% de redução respectivamente.

Tabela 3 – Médias de colesterol total (CT) em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle (G2) de galinhas poedeiras submetidas aos tratamentos nos tempos 0, 21 e 42 dias.

Tratamento	0 dia		21 dias		42 dias	
	CT	CT	% variação	CT	% variação	
G1 – R	111,20 <sup>a</sup>	158,07 <sup>a</sup>	-	114,98 <sup>b</sup>	-	
G2 – RC	152,52 <sup>a</sup>	246,44 <sup>a</sup>	-	261,27 <sup>a</sup>	-	
G3 – RCN	145,42 <sup>a</sup>	138,91 <sup>a</sup>	-43,63	157,83 <sup>ab</sup>	-39,59	
G4 – RCR	89,33 <sup>a</sup>	166,38 <sup>a</sup>	-32,49	135,59 <sup>ab</sup>	-48,10	
G5 – RCNR	67,97 <sup>a</sup>	228,50 <sup>a</sup>	-7,28	241,47 <sup>ab</sup>	-7,58	
G6 – RCA	72,64 <sup>a</sup>	115,60 <sup>a</sup>	-53,09	108,09 <sup>b</sup>	-58,62	

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tuckey ( $p > 0,05$ ).

R = ração básica

RC = ração básica com colesterol

RCN = ração básica com colesterol + naringina

RCR = ração básica com colesterol + rutina

RCNR = ração básica com colesterol + naringina + rutina

RCA = ração básica com colesterol + atorvastatina



Os valores médios do colesterol-HDL não foram estatisticamente diferentes tanto em relação aos tempos quanto aos tratamentos, conforme Tabela 4. Porém, constatou-se uma redução nas concentrações sanguíneas de HDL de 15,14% e 21,99% para a associação dos flavonóides rutina + naringina (Grupo 5) e atorvastatina (Grupo 6) aos 21 dias de tratamento, respectivamente. Aos 42 dias, a redução dos valores desta lipoproteína foram ainda maiores, 21%, 34,84%, 34,62% e 34,65% para os grupos que receberam naringina, rutina, naringina + rutina e atorvastatina, respectivamente.

Tabela 4 – Médias de colesterol-HDL em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle (G2) de galinhas poedeiras submetidas aos tratamentos nos tempos 0, 21 e 42 dias.

Tratamento	0 dia	21 Dias		42 Dias	
	HDL	HDL	% variação	HDL	% variação
G1 – R	27,54 <sup>a</sup>	26,62 <sup>a</sup>	-	26,86 <sup>a</sup>	-
G2 – RC	26,04 <sup>a</sup>	33,15 <sup>a</sup>	-	45,43 <sup>a</sup>	-
G3 – RCN	25,06 <sup>a</sup>	31,34 <sup>a</sup>	-5,46	35,89 <sup>a</sup>	-21,00
G4 – RCR	19,36 <sup>a</sup>	32,98 <sup>a</sup>	-0,51	29,60 <sup>a</sup>	-34,84
G5 – RCNR	17,11 <sup>a</sup>	28,13 <sup>a</sup>	-15,14	29,70 <sup>a</sup>	-34,62
G6 – RCA	17,77 <sup>a</sup>	25,86 <sup>a</sup>	-21,99	29,69 <sup>a</sup>	-34,65

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tuckey ( $p < 0,05$ ).

R = ração básica

RC = ração básica com colesterol

RCN = ração básica com colesterol + naringina

RCR = ração básica com colesterol + rutina

RCNR = ração básica com colesterol + naringina + rutina

RCA = ração básica com colesterol + atorvastatina

As médias de colesterol não-HDL demonstrados na Tabela 5 mostram uma diferença estatisticamente significativa para o grupo tratado com atorvastatina somente aos 42 dias do experimento. Os valores dos percentuais de redução em relação ao grupo controle foram consideráveis tanto aos 21 dias (43,63%, 32,49% e 53,09%), quanto aos 42 dias (39,59%, 48,1% e 41,37%) para os grupos tratados com naringina, rutina e atorvastatina, respectivamente.

Tabela 5 – Médias de colesterol não-HDL (nHDL) em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle (G2) de aves submetidas aos tratamentos nos tempos 0, 21 e 42 dias.

Tratamento	0 dia		21 dias		42 dias	
	NHDL	NHDL	% variação	nHDL	% variação	
G1 – R	83,66 <sup>a</sup>	131,44 <sup>a</sup>	-	88,12 <sup>bc</sup>		
G2 – RC	121,33 <sup>a</sup>	213,29 <sup>a</sup>	-	210,83 <sup>a</sup>	-	
G3 – RCN	120,35 <sup>a</sup>	107,57 <sup>a</sup>	-49,57	121,94 <sup>abc</sup>	-42,16	
G4 – RCR	69,97 <sup>a</sup>	133,39 <sup>a</sup>	-37,46	105,98 <sup>abc</sup>	-49,73	
G5 – RCNR	50,85 <sup>a</sup>	200,35 <sup>a</sup>	-6,07	211,77 <sup>ab</sup>	+0,44	
G6 – RCA	54,87 <sup>a</sup>	89,72 <sup>a</sup>	-57,93	78,40 <sup>c</sup>	-62,81	

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tuckey ( $p < 0,05$ ).

R = ração básica

RC = ração básica com colesterol

RCN = ração básica com colesterol + naringina

RCR = ração básica com colesterol + rutina

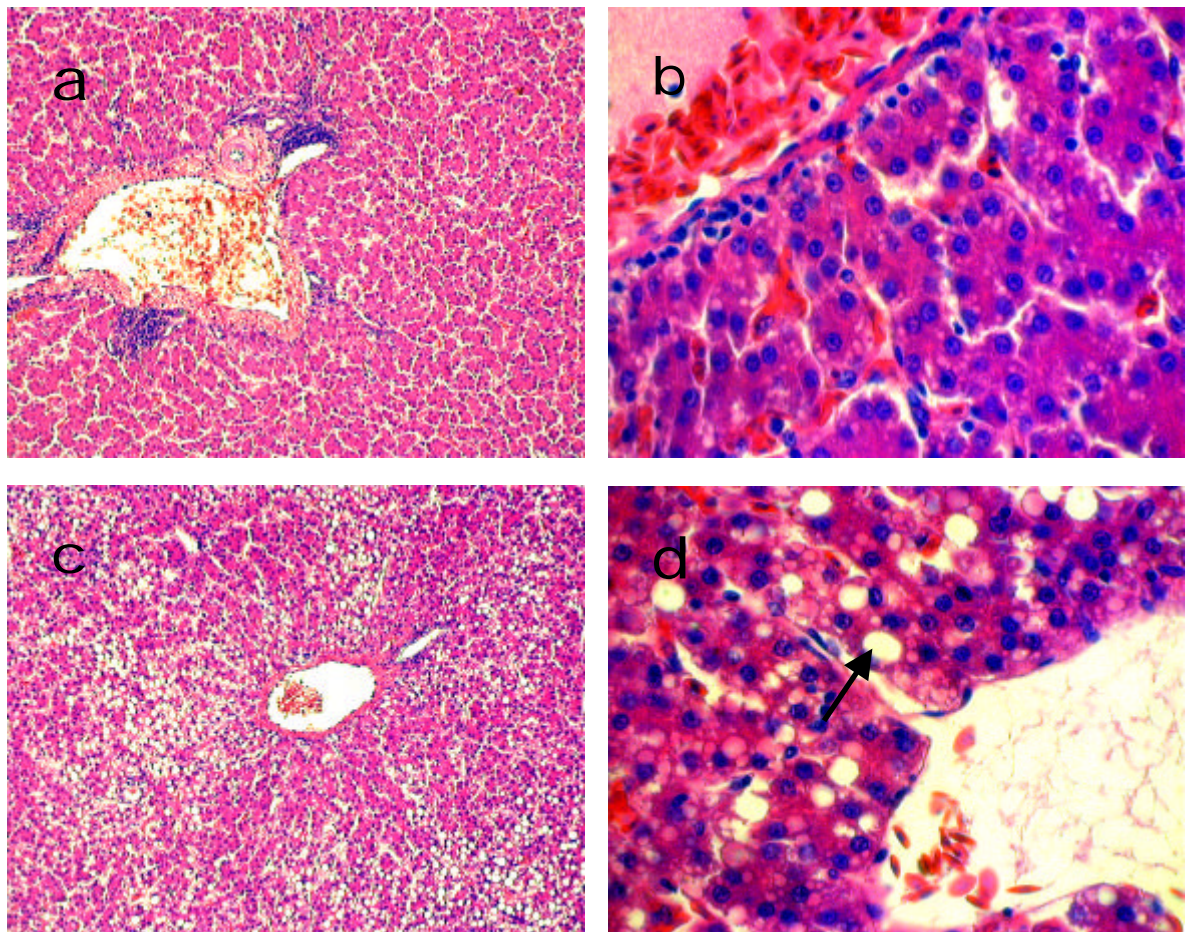
RCNR = ração básica com colesterol + naringina + rutina

RCA = ração básica com colesterol + atorvastatina

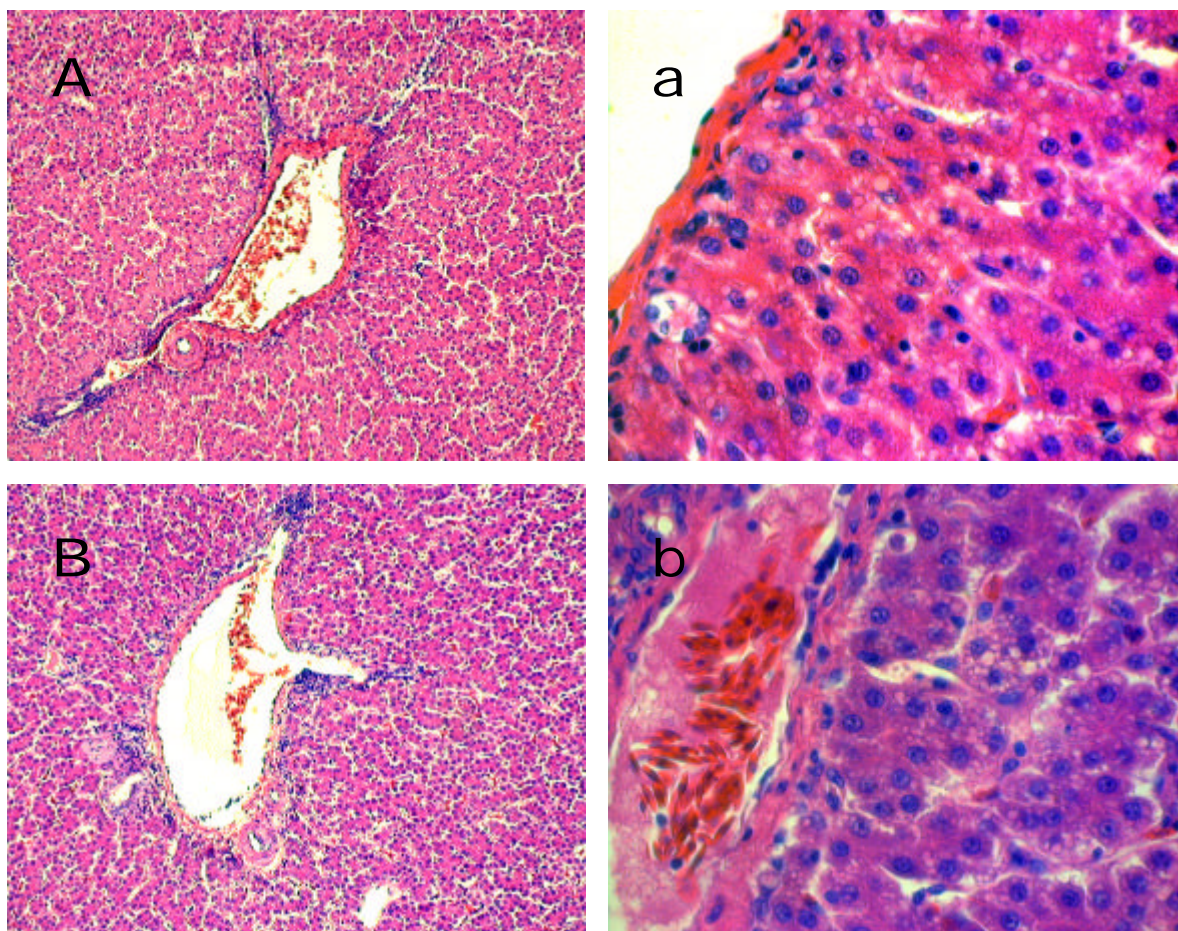
### 3.2 – Análises histopatológicas

A Figura 1 apresenta cortes de tecido hepático do grupo testemunha (a,b), que recebeu somente ração básica e do grupo controle (c,d), que recebeu suplementação de 1% de colesterol na ração. O grupo controle demonstra presença de vacúolos no citoplasma dos hepatócitos, que pode ser caracterizada como esteatose hepática. No grupo testemunha essas alterações histopatológicas não foram observadas.

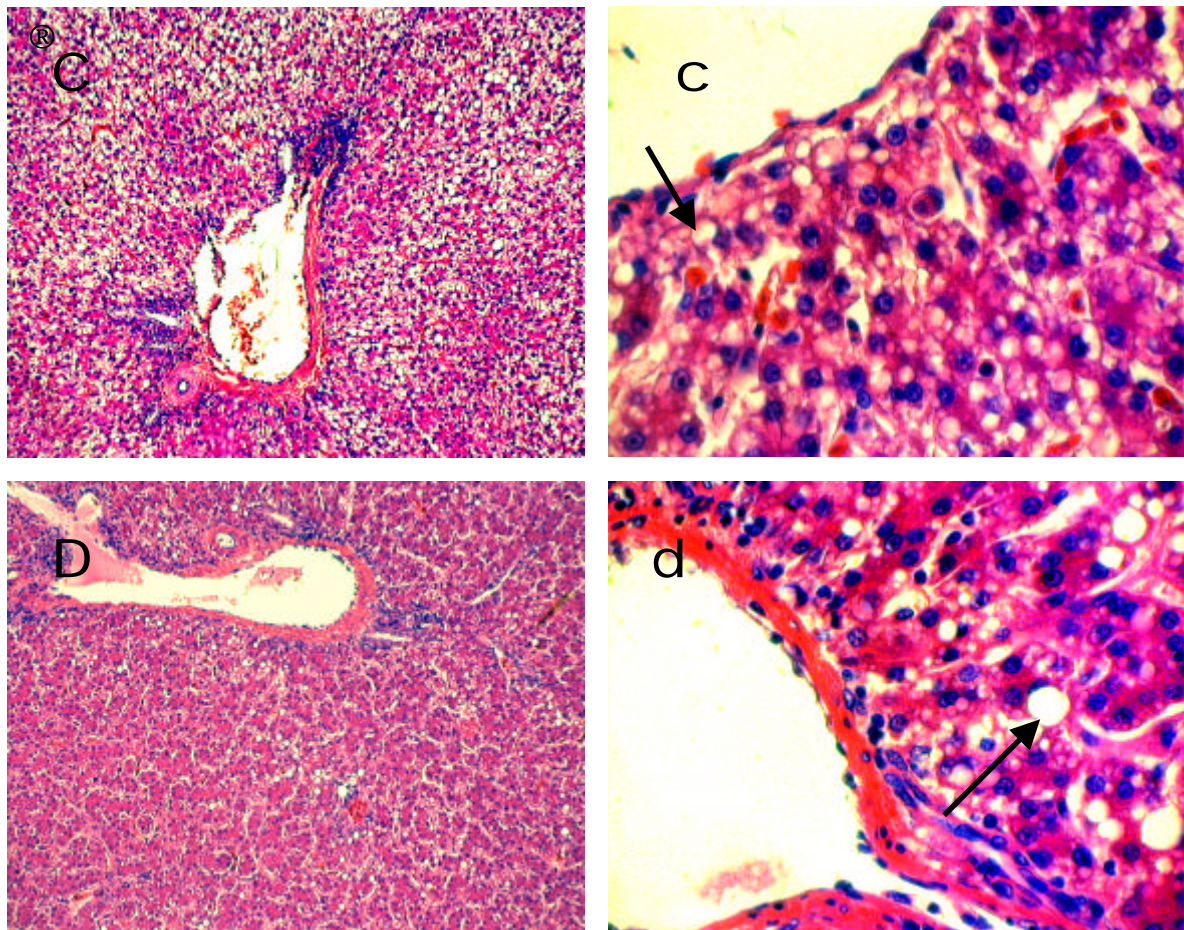
Na análise dos grupos tratados, observaram-se alterações histopatológicas, em relação ao grupo controle (Figura 2 e 3). Os grupos que receberam os flavonóides naringina (Grupo 3) e rutina (Grupo4) foram semelhantes ao grupo testemunha, pois não demonstraram deposição de vacúolos nos hepatócitos. O grupo 6, tratado com atorvastatina, apresentou poucos vacúolos no citoplasma dos hepatócitos. O grupo 5, que recebeu os flavonóides associados naringina e rutina, apresentou presença acentuada de vacúolos no citoplasma dos hepatócitos.



**Figura 1** – Histologia do fígado de aves após seis semanas de experimentação. **a** (70X) e **b** (330X), grupo 1 (testemunha), sem alterações histológicas. **c** (70X) e **d** (330X), grupo 2 (controle, 1% de colesterol), com distribuição centrolobular da degeneração gordurosa dos hepatócitos (seta). HE.



**Figura 2** – Histologia do fígado de aves após seis semanas de experimentação. **A** (70X) e **a** (330X), grupo 3 (1% de colesterol + 30mg de naringina). **B** (70X) e **b** (330X), grupo 4 (1% de colesterol + 30mg de rutina). HE.



**Figura 3** – Histologia do fígado de aves após seis semanas de experimentação. **C** (70X) e **c** (330X), grupo 5 (1% de colesterol + 15mg de naringina e 15mg de rutina). **D** (70X) e **d** (330X), grupo 6 (1,0% de colesterol + 10mg de atorvastatina). Degeneração gordurosa dos hepatócitos (seta).

## 4 – DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste estudo mostram redução nas concentrações de triacilgliceróis, colesterol total e colesterol não-HDL após 21 e 42 dias de tratamento para os grupos tratados com os flavonóides naringina e rutina, e com o fármaco atorvastatina (Tabela 2, 3 e 5), quando comparados ao grupo controle. Estudos em mamíferos têm demonstrado que os flavonóides, assim como a atorvastatina, exercem efeito hipocolesterolemiantes.

PARK et al. (2002) observaram redução na atividade da enzima HMG-CoA redutase, principal reguladora da biossíntese do colesterol, e das concentrações plasmáticas de colesterol, em ratos hipercolesterolêmicos que foram tratados com rutina. Assim como BOK et al. (1999) obtiveram redução na atividade da HMG-CoA redutase e nas concentrações plasmáticas de colesterol em estudo realizado com ratos que receberam uma dieta elevada em colesterol e foram tratados com naringina + hesperidina.

ANILA e VIJAYALAKSHMI (2002) observaram que a administração de flavonóides em ratos mostrou uma inibição significativa na atividade da HMG-CoA redutase e um aumento na excreção fecal de ácidos biliares e esteróides neutros, ocasionando redução nas concentrações plasmáticas de colesterol. Segundo esses autores, observou-se um aumento na atividade da LCAT plasmática, que está envolvida no transporte do colesterol de tecidos extra-hepáticos para o fígado, o que pode contribuir com a degradação do colesterol pela formação de ácidos biliares. Também foi detectada uma redução significativa nas concentrações de LDL e VLDL colesterol, enquanto que HDL se manteve inalterada, ao contrário do nosso estudo, onde HDL foi reduzida nos grupos tratados com rutina, naringina e atorvastatina, ocasionando um efeito negativo pelas propriedades anti-aterogênicas desta lipoproteína. A redução nas concentrações de triacilgliceróis no plasma e nos tecidos, observada por estes autores, pode ser justificada pelo aumento da atividade da lipase lipoprotéica causada pelos flavonóides.

Outros efeitos, envolvendo propriedades hipocolesterolemiantes dos flavonóides têm sido evidenciados. Naringenina e esperidina diminuíram a síntese do colesterol pela inibição da ACAT, que está envolvida na formação de ésteres de colesterol para a secreção hepática da VLDL; reduziram a atividade da MTP, que é

essencial para a secreção hepática de lipoproteínas contendo apoB, pois media a transferência de triacilgliceróis, colesterol esterificado e fosfolípidios para a apoB nascente, e aumentaram a expressão dos receptores da LDL, reduzindo o acúmulo de colesterol nas artérias (BORRADAILE et al., 1999; WILCOX et al., 2001; LEE et al., 2003).

As estatinas, inibidores da HMG-CoA redutase, têm sido desenvolvidas para utilização na redução nas concentrações plasmáticas do colesterol em pacientes hiperlipêmicos. Seus efeitos farmacológicos já são comprovados em modelos animais e humanos. Estudos mostram que a atorvastatina reduz a atividade da HMG-CoA redutase, resultando na inibição da biossíntese do colesterol hepático; aumenta os receptores hepáticos de LDL, reduzindo assim os níveis plasmáticos desta lipoproteína; diminui a atividade da ACAT e da CETP, as quais desempenham uma importante função na quantidade de éster de colesterol incorporados nas lipoproteínas. Além disso, uma baixa atividade da CETP é correlacionada com o aumento nas concentrações da HDL, lipoproteína antiaterogênica (MARAIS et al., 1997; NESS et al., 1998; CONDE et al., 1999).

Galinhas poedeiras geralmente suprem sua necessidade de colesterol somente pela via da síntese de novo e sua homeostase é dificilmente regulada pela inibição da biossíntese hepática através de agentes farmacológicos. ELKIN et al. (1999) realizaram o primeiro estudo para examinar os efeitos fisiológicos dos inibidores da HMG CoA redutase como atorvastatina, lovastatina e simvastatina nesta espécie. Não houve efeito, conforme esperado, na redução hepática da atividade HMG CoA redutase. Apesar da redução nas concentrações plasmáticas e hepáticas do colesterol, houve um aumento de duas vezes na atividade desta enzima nos grupos tratados em relação ao controle. Acredita-se que este efeito compensatório ocorra somente em aves, pois outras espécies têm demonstrado o contrário, conforme discutido anteriormente.

Baseado em estudos anteriores em mamíferos, este estudo mostrou resultados semelhantes. Porém, a relação destes resultados pode não ser estabelecida ao avaliarmos as diferenças existentes no metabolismo lipídico de galinhas poedeiras. A maioria do colesterol plasmático nesta espécie está na forma de VLDL, ao passo que, em humanos normolipêmicos, hamsters, coelhos, ratos, cobaias e cães, LDL e HDL são os principais transportadores do colesterol (ELKIN et

al., 1999). Além disso, a maior rota de excreção do colesterol em galinhas ocorre através da gema do ovo (NABER, 1983). Enquanto que em outras espécies ocorre através de excreção de sais biliares e esteróis neutros.

Em aves, as lipoproteínas estão no ovócito em crescimento (futura gema do ovo) e a liberação de lipídios para tecidos específicos ocorre em resposta a uma necessidade fisiológica ou nutricional. O metabolismo de galos ou galinhas imaturas é similar ao dos mamíferos. Em contrapartida, o metabolismo de galinhas poedeiras é muito diferente, devido ao sistema de liberação de grandes quantidades de lipoproteínas hepaticamente sintetizadas para o crescimento dos ovócitos (ELKIN, 1997). Em galinhas, vitelogenina e VLDL são as maiores lipoproteínas precursoras da gema, sintetizadas pelo fígado sob controle do estrogênio, secretadas na corrente sanguínea e transportadas para o ovário, onde serão captadas pelo ovócito em crescimento, via receptor, por endocitose (SCHNEIDER, 1996).

O fígado e o ovário são os locais primários da biossíntese do colesterol em galinhas poedeiras. No entanto, a maioria do colesterol a ser transferido através da membrana do ovário para a formação da gema do ovo, é originado do fígado (NABER, 1983). VLDL e HDL são as duas principais classes de lipoproteínas sintetizadas no fígado. A apolipoproteína B-100 e Apo A-I são as maiores apolipoproteínas de VLDL e HDL em galinhas, respectivamente (HERMIER, 1997).

Seguindo a biossíntese no fígado, o colesterol é primariamente incorporado em partículas de VLDL e secretado na corrente sanguínea (GRIFFIN, 1992). Ao contrário da VLDL em mamíferos, a VLDL em galinhas poedeiras não sofre lipólise na circulação, devido à presença de grandes quantidades de apolipoproteína VLDL-II, uma apolipoproteína inibidora da lipase lipoproteica, que é sintetizada pela influência de estrógeno (MACLACHLAN et al., 1996; SCHNEIDER et al., 1990). Assim, em vez de aumentar primariamente para lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e sua conversão subsequente em LDL, VLDL chega ao ovócito virtualmente intacta, onde será internalizada por um receptor e transformada intracelularmente em gema (BUJO et al., 1994, SCHNEIDER, 1996). Além disso, a maioria do colesterol na VLDL em galinhas poedeiras encontra-se na forma não esterificada (GRIFFIN, 1992).

Uma hipótese estudada por WALZEM et al. (1999) revela que galinhas poedeiras secretam lipoproteína VLDL concomitante, no fígado e no rim, porém com



características diferentes. A VLDL secretada nos hepatócitos apresenta um diâmetro menor (~30nm) e é revestida com apolipoproteína VLDL-II, que bloqueia a ação da hidrólise pela lipase lipoprotéica, a qual atravessa os capilares ovarianos e chega intacta no ovócito para formação da gema do ovo. A VLDL secretada nas células dos túbulos proximais do rim apresenta um diâmetro maior (~60nm) e contém apo C-II, que ativa a lipase lipoprotéica, hidrolisa a lipoproteína que fornecerá ácidos graxos livres aos tecidos como músculo cardíaco, esquelético e adiposo. A expressão do gen para apoVLDL-II e apoB no fígado é estrógeno responsiva, enquanto que a expressão do gen apoB no rim não é estrógeno responsiva (LAZIER et al., 1994).

A síntese de ácidos graxos em aves e mamíferos depende da disponibilidade de carboidratos dietéticos. Em animais alimentados, a insulina estimula a atividade de enzimas envolvidas na lipogênese, principalmente a malato desidrogenase (MD) e ácido graxo sintase (FAS). Em galinhas poedeiras, a lipogênese hepática é dramaticamente acentuada pelo estrógeno, conforme demanda ordenada pela vitelogênese (HERMIER, 1997).

Neste estudo, a análise histopatológica das artérias não apresentou alterações. Considerando o metabolismo lipídico nesta espécie, acredita-se que lesões ateroscleróticas sejam dificilmente desenvolvidas, pois SUTTON et al. (1984), indicam que o aumento de colesterol dietético gera um aumento em sua excreção através da gema do ovo. No entanto, lesões nas artérias coronarianas com a presença de células espumosas e focos necróticos foram encontradas em galos e galinhas não poedeiras, sendo que apenas pequenas quantidades de lipídios e células espumosas foram observadas na túnica íntima em galinhas poedeiras (TODA et al., 1980).

O aumento de gordura no fígado de aves ocorre quando a lipogênese excede a capacidade da síntese e secreção de lipoproteínas (HERMIER, 1997). Em nosso estudo observou-se a presença de uma grande quantidade de vacúolos no fígado, caracterizando uma esteatose hepática, no grupo controle (Figura 1c) e no grupo que recebeu flavonóides associados, naringina + rutina (Figura 3C). O grupo suplementado com atorvastatina (Figura 3D) apresentou alterações menos pronunciadas.

A esteatose hepática ocorre devido a um acúmulo específico de triacilgliceróis entre as células do parênquima, porém, seu mecanismo é pouco conhecido. Um defeito na incorporação de triacilgliceróis na VLDL nascente pode ser responsável pelo acúmulo de lipídios hepáticos nesta espécie, assim como uma possível regulação hormonal que não tenha acompanhado a secreção excessiva de triacilgliceróis no fígado (HERMIER et al., 1994).

As alterações hepáticas ocorridas neste estudo necessitam investigações futuras para melhor entendimento dos mecanismos que desencadearam esse efeito.

## **5 – CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram melhores efeitos da atorvastatina na redução das concentrações plasmáticas de triacilgliceróis, colesterol total e colesterol não-HDL aos 21 e 42 dias de tratamento. Nos tratamentos com flavonóides, aos 21 dias obteve-se melhores resultados dos valores de triacilgliceróis, colesterol total e colesterol não-HDL para o grupo tratado com naringina, enquanto que, aos 42 dias esses resultados foram mais efetivos para o grupo tratado com rutina. Referente aos valores de HDL, observou-se que atorvastatina teve um efeito negativo, devido a redução desta lipoproteína.

De acordo com esses resultados, conclui-se que os grupos suplementados com os flavonóides naringina, rutina, naringina+rutina e atorvastatina demonstraram propriedades hipolipemiantes em galinhas poedeiras. Apesar da semelhança dos resultados obtidos em outros estudos discutidos anteriormente, a relação dos efeitos e mecanismos de ação destas substâncias na espécie utilizada, com outras espécies animais, necessitam investigações mais detalhadas.

Galinhas poedeiras apresentam muitas diferenças no metabolismo lipídico em comparação com outros modelos experimentais, devido a interferências hormonais e diferentes rotas metabólicas voltadas à produção de ovos. A extrapolação dos resultados torna-se difícil, pois estudos anteriores nesta espécie são praticamente inexistentes. Segere-se pesquisas envolvendo a investigação dos mecanismos de ação das enzimas, bem como a avaliação concomitante do metabolismo lipídico na produção de ovos, para melhor entendimento dos resultados.

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAIN, C.C., POON, L.S., CHAN, C.S. et al. Enzymatic determination of total cholesterol. **Clinical Chemistry**. 20:470-475, 1974.

ANILA, L., VIJAYALAKSHMI, N.R. Flavonoids from *Embilica officinalis* and *Mangifera indica* – effectiveness for dyslipidemia. **J. of Ethnopharmacology**. 79:81-87, 2002.

ASSMAN, G., SCHRIEWER, H., SCHMITZ, G., HAGELE, E.O. Quantification of high-density-lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid/MgCl<sub>2</sub>. **Clinical Chemistry**. 29:2026-2030, 1983.

BERLINER, J.A., NAVAB, M., FOGELMAN, A.M. et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. **Circulation**. 91:2488–96, 1995.

BOK, S.H.; LEE, S.H.; PARK, Y.B., et al. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl-CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. **J. Nutr**. 129:1182-1185, 1999.

BORRADAILE, N.M., CAROLL, K.K., KUROWSKA, E.M., Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavonones hesperitin and naringenin. **Lipids**. 34:591-598, 1999.

BUJO, H., HERMANN, M., KADERLI, M.O. et al. Chicken oocyte growth is mediated by and eighth ligand binding repeat member of the LDL receptor family. **EMBO J**. 13:5165-5175, 1994.

CONDE, K., PINEDA, G., NEWTON, R.S. et al. Hypocholesterolemic effects of 3-hidroxi-e-methylglutaryl coenzima A (HMG-CoA) reductase inhibitors in the guinea pig. **Biochem. Pharmacol**. 58:1209-1219, 1999.

ELKIN, R.G. An overview of recent developments in avian lipoprotein metabolism. **J. Nutr**. 127:793S-794S, 1997.

ELKIN, R.G.; YAN, Z.; ZHONG, Y. et al. Select 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors vary in their ability to reduce egg yolk cholesterol levels in laying hens through alteration of hepatic cholesterol biosynthesis and plasma VLDL composition. **J. Nutr**. 129: 1010-1019, 1999.

FOSSATI, P., PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**. 28:2077-2080, 1982.

FUHRMAN, B., AVIRAM, M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. **Curr. Opin. Lipidol**. 12:41-48, 2001.

FUHRMAN, B.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; et al. Antiatherosclerotic effects of licorice extract supplementation on hypercholesterolemic patients: increased resistance

of LDL to atherogenic modifications, reduced plasma lipid levels and decreased systolic blood pressure. **Nutrition**. 18:268-273, 2002.

GRIFFIN, H.D. Manipulation of egg yolk cholesterol: A physiologist's view. **World's Poultry Sci. J.** 48:101-112, 1992.

HERMIER, D. Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. **J. Nutr.** 127:805S-808S, 1997.

HERMIER, D., ROUSSELOT-PAILLEY, D., PERESSON, R. et al. Influence of orotic acid and estrogen on hepatic lipid storage and secretion in the goose susceptible to liver steatosis. **Biochim. Biophys. Acta.** 1211:97-106, 1994.

HERTOG, M.G.; FESKINS, E.J.; HOLLMAN, P.C. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Ederly Study. **Lancet**.342:1007-1011, 1993.

LAZIER, C.B., WILKTOROWICZ, M., DIMATTIA, G.E. et al. Apolipoprotein (apo) B and apoll gene expression are both estrogen-responsive in chick embryo liver but only apoll is estrogen-responsive in kidney. **Mol. Cell. Endocrinol.** 106:187-194, 1994.

LEE, M.K., MOON, S.S, LEE,S.E. et al. Naringenin 7-O-cetyl ether as inhibitor of HMG – CoA reductase and modulator of plasma and hepatic lipids in high cholesterol – fed rats. **Bioorganic & Med. Chem.** 11:393-398, 2003.

MACLACHLAN, I., STEYRER, E., HERMETTER, A., et al. Molecular characterization of quall apolipoprotein very-low-density lipoprotein II: Disulphide-bond-mediated dimerization is not essential for inhibition of lipoprotein lipase. **Biochem. J.** 317:599-604, 1996.

MARAIS, A.D., FIRTH, J.C., BATEMAN, M.E. et al. Atorvastatin: An effective lipid-modifying agent in familial hypercholesterolemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 17:1527-1531, 1997.

NABER. E.C. Nutrient and drug effects on cholesterol metabolism in the laying hen. **Federation. Proc.** 42:2486-2493, 1983.

NESS, G.C., CHAMBERS, C.M., LOPEZ, D. Atorvastatin action involves diminished recovery of hepatic HMG-CoA reductase activity. **J. lipid. Res.** 39:75-84, 1998.

PAN, W.H., CHIANG, B.N. Plasma lipid profiles and epidemiology of atherosclerotic diseases in Taiwan – a unique experience. **Atherosclerosis.** 118:285-295, 1995.

PARK, S.Y., BOK, S.H., JEON, S.M. et al. Effect of rutin and acid tannic supplements on cholesterol metabolism in rats. **Nutr. Res.** 22:283-295, 2002.

RIBEIRO Jr., J.I. Análises estatísticas no SAEG. Ed. **Folha de Viçosa**, Viçosa MG. 310p, 2001.

SILVA, R.R. Modelos de indução de hiperlipidemia e avaliação do efeito hipolipidêmico de flavonóides e corantes naturais em frangos de corte. Viçosa:UFV, 2001. 127p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.

SCHAEFER, E.J. Lipoproteins, nutrition and heart disease. **Am. J. Clin. Nutr.** 75:191-212, 2002.

SCHARTZ, C.J., VALENTE, A.J., SPREGUE, E.A. The patogenesis of atherosclerosis. An overview. **Clin. Cardiol.** 14:11-16, 1991.

SCHNEIDER, W.J., CAROLL, R., SEVERSON, D.L., NIMPF, J. Apolipoprotein VLDL-II inhibits lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins in laying hen. **J. Lipid. Res.** 31:507-513, 1990.

SCHNEIDER, W.J. Vitellogenin receptors: oocyte-specific members of the low-density lipoprotein receptor supergene family. **Int. Rev. Cytol.** 166:103-137, 1996.

SUTTON, C.D., MUIR, W.M., MTCHELL, G.E. Cholesterol metabolism in the laying hen as influenced by dietary cholesterol, caloric intake and genotype. **Poultry Science.** 63:972-980, 1984.

TARLOW, D.M., WATKINS, P.A., REED, R.E. et al. Lipogenesis and the syntesis and secretion of very low density lipoprotein by avian liver cells in nonproliferating monolayer culture. Hormonal effects. **J. Cell. Biol.** 73:332-353, 1977.

TODA, T., LESZCZYNSKI, D., MCGIBBON. W.H. et al. Coronary arterial lesions in sexually mature non-layers, layers and roosters. **Path. Anat. and Hist.** 388:123-135, 1980. (Abst.).

VOYIAZIASKIS, E., GOLDEMBERG, I.J., PLUMP, A.S. et al. ApoA-I deficiency causes both hypertriglyceridemia and increased atherosclerosis in human apoB transgenic mice. **J. Lipid. Res.** 39:313-321, 1998.

WALZEM, R.L. et al. Estrogen induction of VLDL assembly in egg-laying hens. **J. Nutr.** 129:467s-472s, 1999.

WILCOX, L.J., BORRADAILE, N.M., DREU, L.E. et al. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and exoression of ACAT2 and MTP. **J. Lipid. Res.** 42:725-734, 2001.

XU, R.; YOKOYOAMA, W.H.; IRVING, D. et al.. Effect of dietary catechin and vitamina E on aortic fatty streak accumulation in hypercholesterolemic hamsters. **Atherosclerosis.** 137:29-36, 1998.

WILLIAMS, K.J., TABAS, I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. **Arterioscle.r Thromb. Vasc. Biol.**15:551-561, 1995.

## APÊNDICE

Quadro 1 - Resumo da Análise das Variáveis coeficiente de eficiência alimentar (CEA), ingestão alimentar total (IAT), ganho de peso (GP), glicose (G), triadiglicerol (TG), colesterol total (CT), HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol em cobaias:

FV	GL	Quadrados Médios								
		CEA	IAT	GP	G	TG	CT	HDL	LDL	VLDL
G	4	0.17	5241.46	1505.36	424.38	380.48	12230.96*	762.18	7288.61*	15.22
Resíduo	30	0.20	43413.28	2101.19	1984.24	736.88	1707.67	476.71	1454.90	29.47
CV (%)		45.36	61.94	45.51	31.31	37.91	38.98	72.49	61.94	37.91

NS - F não significante ao nível de 5% de probabilidade

\* - F significante ao nível de 5% de probabilidade

\*\* - F significante ao nível de 1% de probabilidade



**Quadro 2** - Resumo da Análise de Variância das variáveis, peso (P), colesterol total (CT), triacilglicerol (TG), HDL-colesterol (HDL) e colesterol não-HDL (n-HDL) em galinhas poedeiras.

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS				
		P	CT	TG	HDL	n-HDL
Grupos (G)	5	37292,59 <sup>NS</sup>	33672,54 <sup>*</sup>	234957,30 <sup>**</sup>	280,04 <sup>NS</sup>	29585,71 <sup>*</sup>
Resíduo (a)	30	16620,40	11006,26	60621,84	212,33	10184,20
Dias (D)	2	10739,81 <sup>NS</sup>	52438,33 <sup>**</sup>	5218423,00 <sup>**</sup>	1089,94 <sup>**</sup>	39420,76 <sup>**</sup>
G x D	10	7688,7 <sup>*</sup>	8095,05 <sup>NS</sup>	101789,70 <sup>*</sup>	94,52 <sup>NS</sup>	7261,74 <sup>*</sup>
Resíduo (b)	60	3712,77	4091,67	43833,17	205,30	3249,97
CV (%) parcela		26,08	69,57	67,08	51,61	82,34
CV (%) subparcela		3,89	42,42	57,04	50,75	46,51

NS - F não significativa ao nível de 5% de probabilidade

\* - F significativa ao nível de 5% de probabilidade

\*\* - F significativa ao nível de 1% de probabilidade

GL – graus de liberdade

CV – coeficiente de variação

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse estudo mostram propriedades hipolipemiantes dos flavonóides nas duas espécies de vertebrados estudadas. Todavia, mais pesquisas são necessários para comprovar os mecanismos de ação, as interações e a biodisponibilidade, bem como os efeitos toxicológicos destas substâncias a longo prazo.

Cobaias representam um bom modelo para o estudo das hiperlipemias, devido à semelhança nas características do metabolismo lipídico em relação aos humanos, já demonstradas em estudos anteriores. Ressalta-se a importância de outros estudos com esse modelo para avaliar, além do perfil lipídico, os mecanismos de ação dos flavonóides, envolvendo dosagens de enzimas integrantes desse metabolismo.

As galinhas poedeiras, por sua vez, apresentam muitas diferenças em comparação ao metabolismo lipídico de outros modelos animais e humanos, pela interferência hormonal nas rotas metabólicas envolvidas na produção de ovos, dificultando o entendimento dos reais efeitos desempenhados pelas substâncias testadas. Em vista disso, ao testar efeitos de fármacos em aves, é recomendável a utilização de galos e galinhas imaturas.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)