

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDO BIOFARMACÊUTICO DA NARINGINA

RICARDO ANTONIO ZATTI

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDO BIOFARMACÊUTICO DA NARINGINA

Dissertação apresentada a Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (CIPHARMA) para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

RICARDO ANTONIO ZATTI

*“Rezo a Deus para ter,
paciência diante das coisas que não posso mudar,
inteligência diante daquelas que consigo mudar
e sabedoria para discernir uma da outra”*

Autor desconhecido

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Adão e Orestina,
que mesmo ausentes foram a inspiração para a realização
desse sonho.*

Agradeço imensamente aos professores Dr. Tanus Jorge Nagem e Dra. Tânia Toledo de Oliveira, pela orientação, incentivo, dedicação, compreensão constante e amizade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde e sabedoria para conduzir esse trabalho.

Ao Professor Tanus J. Nagem, meu orientador, por transmitir conhecimento, corrigir meus erros, e principalmente, pela calma e serenidade com os quais conduziu nosso trabalho.

À Professora Tânia T. de Oliveira, pelo apoio, cordialidade e amizade, proporcionando a realização de etapa fundamental do presente trabalho.

À Escola de Farmácia, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPharma) e a Universidade Federal de Ouro Preto, por oferecer formação superior de qualidade.

Ao CNPq, à FAPEMIG e à Rede Mineira de Farmacologia e Toxicologia pelo apoio na execução deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LAPPRONA) do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, especialmente Rosana Gonçalves e às estagiárias Rúbia Santos Camargo, Najla Moufarreg Drummond de Sá e Débora Aiko Kurano de Salve, pela amizade e envolvimento em todas as etapas do estudo.

À equipe do Laboratório Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, especialmente aos estagiários Vinícius Giori Ferrão, Karen Sericita, Vitor e Ana Paula C. Teles, a aluna de doutorado Eliene, e ao técnico José Geraldo, pelo valioso auxílio durante os experimentos *in vivo*.

À Maria Aparecida Leão, pela ajuda prestada na realização dos ensaios *in vivo*, amizade e apoio constante.

Ao Dr. Agnaldo Rodrigues de Melo Chaves, pela assistência nos estudos estatísticos.

À Profa. Maria Elisabete Barros, pelos auxílios e orientação nos testes de avaliação antifúngica.

Aos professores da Escola de Farmácia, pelos ensinamentos.

Aos funcionários da Escola de Farmácia, especialmente, ao Délio – técnico do Laboratório de Controle de Qualidade e a grande amiga Conceição – funcionária da biblioteca.

Aos mestrandos: Renata Tupinambá, Renata Fontes, Gleice, Lílian, Raquel, Alessandra, Milton e Juliana, pelo companheirismo.

À colega de mestrado e amiga Karina Zanoti, pela grande amizade, pelos conselhos, pelas conversas durante as viagens para Viçosa e por muito me ajudar durante a minha formação científica.

Às amigas e farmacêuticas Lúcia Gomes de Araújo, Letícia Bandeira de Melo Leite, Wânia Ferreira Fontes, Daniela Andriolo e Juliana Saliba, um agradecimento especial, pelo constante incentivo e carinho.

À Ana Rita Santos Maggi, farmacêutica do Hospital das Clínicas da UFMG, pelo incentivo profissional.

Aos meus queridos familiares: Sérgio Zatti, Gilda, Mariana e Serginho, efetivamente presente em todas as circunstâncias.

Aos amigos especiais Maria Alice e Leonardo, pela valiosa amizade, dedicação e companheirismo em todos os momentos.

A todos que diretamente ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de Quadros	xi
Lista de Tabelas	xii
Lista de Figuras	xiv
Lista de Abreviaturas	xvi
Resumo	xviii
Abstract	xx
1. INTRODUÇÃO	21
Referências	26
2. NARINGINA, DIABETES MELLITUS E DISLIPIDEMIA	28
2.1 Introdução	29
2.2 Naringina	31
2.3 Diabetes Mellitus	34
2.4 Dislipidemias	41
Referências	52
3. OBJETIVOS	56
3.1 Objetivo Geral	57
Objetivos Específicos	57
4. ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GASTRINTESTINAL	58
4.1 Introdução	59
4.2 Materiais e Métodos	61
4.2.1 Perfil de Dissolução	61
4.2.2 Avaliação da Estabilidade Gastrointestinal da Naringina	62
4.2.3 Desenvolvimento Farmacotécnico	63

4.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial	64
4.3 Resultados e Discussão	64
4.4 Conclusões	71
Referências	72
5. AVALIAÇÃO BIOFARMACOTÉCNICA DE CÁPSULAS E COMPRIMIDOS DE NARINGINA	74
5.1 Introdução	75
5.2 Materiais e Métodos	77
5.2.1 Padronização de método analítico para determinação de naringina	77
5.2.2 Ensaios Físicos e Físico-químicos	78
5.3 Resultados e Discussão	81
5.4 Conclusões	88
Referências	89
6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICA DA NARINGINA	90
6.1 Introdução	91
6.2 Materiais e Métodos	93
6.2.1 Avaliação da Atividade Antioxidante	93
6.2.2 Avaliação da Atividade Antifúngica	94
6.3 Resultados e Discussão	95
6.4 Conclusões	97
Referências	
7. EFEITO DA NARINGINA NO TRATAMENTO DO DIABETES	100
7.1 Introdução	101
7.2 Materiais e Métodos	103
7.2.1 Cápsulas e Comprimidos	103
7.2.2 Animais	104
7.2.3 Período de Adaptação	104
7.2.4 Indução da Diabetes	105
7.2.5 Grupos Experimentais	105
7.2.6 Tratamentos	106
7.2.7 Dosagens de Parâmetros Sanguíneos	106
7.2.8 Eutanásia	106

7.2.9 Estatística	106
7.3 Resultados e Discussão	107
7.4 Conclusões	116
Referências	116
8. AVALIAÇÃO HIPOCOLESTEROLEMIANTE DA NARINGINA	119
8.1 Introdução	120
8.2 Materiais e Métodos	123
8.2.1 Cápsulas e Comprimidos	123
8.2.2 Animais	123
8.2.3 Período de Adaptação	123
8.2.4 Indução da Diabetes	123
8.2.5 Grupos Experimentais	124
8.2.6 Tratamentos	124
8.2.7 Dosagens de Parâmetros Sanguíneos	124
8.2.8 Eutanásia	125
8.2.9 Estatística	125
8.3 Resultados e Discussão	125
8.4 Conclusões	133
Referências	134
9. CONCLUSÕES	136

Lista de Quadros

	Página
QUADRO 1 Classificação etiológica do Diabetes	35
QUADRO 2 Classificação dos hipoglicemiantes de uso oral e seu mecanismo de ação	39
QUADRO 3 Classificação das Dislipidemias	43
QUADRO 4 Valores de referência para lipídeos em adultos	44
QUADRO 5 Especificação do ensaio para avaliação do perfil de dissolução da naringina e naringenina	61
QUADRO 6 Composição do fluido gástrico simulado e do fluido intestinal simulado	63
QUADRO 7 Sistema de eluição gradiente	63
QUADRO 8 Condições para o teste e perfil de dissolução dos comprimidos e cápsulas de naringina	80

Lista de Tabelas

	Página
TABELA 1 Percentagem de naringina e naringenina dissolvida em 45 minutos	64
TABELA 2 Percentagem de dissolução da naringina (NA) e naringenina (NG) em função do tempo	65
TABELA 3 Teor (em µg/mL) de naringina após exposição aos meios FGS e FIS	66
TABELA 4 Curvas de calibração obtida a partir da análise da naringina por HPLC	81
TABELA 5 Valores de área utilizadas no cálculo da precisão	83
TABELA 6 Peso médio e dureza, expressos como média ± desvio-padrão	83
TABELA 7 Tempos de desintegração	84
TABELA 8 Teor de naringina nos produtos A (lotes 1, 2 e 3) e B (lotes 1, 2 e 3)	85
TABELA 9 Percentagem de naringina (NA) nas formulações de comprimidos após teste de dissolução	86
TABELA 10 Percentagem de naringina (NA) nas formulações de cápsulas após teste de dissolução	87
TABELA 11 Concentração inibitória mínima da naringina, naringenina, rutina, lapachol e mentol pelo método de microdiluição em placas contra <i>Candida</i> sp.	
TABELA 12 Constituição dos grupos experimentais - Diabetes	
TABELA 13 Valores médios de glicose no plasma de coelhos após 28 dias de tratamento com naringina	

TABELA 14 Valores médios de triglicerídeos no plasma de coelhos após 28 dias de tratamento com naringina	
TABELA 15 Valores médios de HDL-colesterol e colesterol total no plasma de coelhos após 28 dias de tratamento com naringina	111
TABELA 16 Valores médios de creatinina e uréia no plasma de coelhos após 28 dias de tratamento com naringina	112
TABELA 17 Valores médios de TGO (AST) e TGP (ALT) no plasma de coelhos após 28 dias de tratamento com naringina	113
TABELA 18 Valores médios de gama-GT e ácido úrico no plasma de coelhos após 28 dias de tratamento com naringina	114
TABELA 19 Valores médios de proteínas totais e albumina no plasma de coelhos após 28 dias de tratamento com naringina	115
TABELA 20 Constituição dos grupos experimentais - Hiperlipidemia	124
TABELA 21 Valores médios de colesterol total no plasma de coelhos hiperlipidêmicos após 28 dias de tratamento com naringina	126
TABELA 22 Valores médios de HDL-colesterol e triacilgliceróis no plasma de coelhos hiperlipidêmicos após 28 dias de tratamento com naringina	127
TABELA 23 Valores médios de creatinina e albumina no plasma de coelhos hiperlipidêmicos após 28 dias de tratamento com naringina	129
TABELA 24 Valores médios de TGO, TGP e gama-GT no plasma de coelhos hiperlipidêmicos após 28 dias de tratamento com naringina	131
TABELA 25 Valores médios de glicose no plasma de coelhos hiperlipidêmicos após 28 dias de tratamento com naringina	133

Lista de Figuras

	Página
FIGURA 1 Estrutura básica dos flavonóides	22
FIGURA 2 Estrutura química da naringina e naringenina	31
FIGURA 3 Hidrólise da naringina em prunina, rhamnose, naringenina e glicose	32
FIGURA 4 Perfis de dissolução de naringina e naringenina em água	66
FIGURA 5 Cromatogramas de concentração da Naringina em função do tempo de exposição ao fluido gástrico simulado: (A) Tempo 0; (B) Tempo 60 minutos; (D) Tempo 90 minutos e (E) Tempo 120 minutos	67
FIGURA 6 Curva DSC da naringina obtida sob atmosfera dinâmica de nitrogênio e razão de aquecimento de 10° C/minuto	68
FIGURA 7 Curva DSC da mistura 1:1 da naringina com celulose microcristalina (1), estearato de magnésio (2), lauril sulfato de sódio (3) e talco (4) obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio e razão de aquecimento de 10° C/ minuto	70
FIGURA 8 Curva DSC da naringina-excipientes na proporção descrita no desenvolvimento farmacotécnico dos comprimidos e cápsulas	71
FIGURA 9 Curva de calibração da naringina	82
FIGURA 10 Cromatograma de solução amostra na concentração de 0,01 mg/mL, onde se observa pico relativo à naringina no tempo de retenção de 6,36 minutos	82
FIGURA 11 Curva de calibração para quantificação de naringina (NA) nos meios de dissolução	85
FIGURA 12 Perfis de dissolução de cápsulas e comprimidos de naringina em água	87

- FIGURA 13** Perfis de dissolução de cápsulas e comprimidos de naringina em HCl 0,1M 87
- FIGURA 14** Perfis de dissolução de cápsulas e comprimidos de naringina em tampão fosfato pH 6,8 88
- FIGURA 15** Concentração de DPPH remanescente nas amostras de rutina, naringina, naringenina e BHA no tempo de reação 30 minutos 96
- FIGURA 16** Comportamento cinético dos flavonóides rutina, naringina e naringenina na concentração 100 µg/mL frente ao DPPH 96
- FIGURA 17** Médias de glicose por grupo após 28 dias de tratamento 107
- FIGURA 18** Média de colesterol total em soro de coelhos após 28 dias de tratamento 126

Lista de Abreviaturas

- AAI** Anticorpos antiinsulina
- ANTI-GAD** Anticorpos contra a descarboxilase do ácido glutâmico
- ANTI-IA2** Anticorpos antitirosina peroxidase
- ALT** Alanina aminotransferase
- AST** Aspartato aminotransferase
- AVC** Acidente vascular cerebral
- BHA** Butil-hidroxi-anisol
- CETP** Proteína transferidora de estéreis de colesterol
- CIM** Concentração inibitória mínima
- CCD** Cromatografia em camada delgada
- DAD** Diode array detection
- DM** Diabetes Mellitus
- DMSO** Dimetilsulfoxido
- DPPH** Reagente 2.2-difenil-1-picril-hidrazila-DPPH
- DPR** Desvio-padrão relativo
- DSC** Calorimetria diferencial de varredura
- FFSO** Formas farmacêuticas sólidas de uso oral
- FGS** Fluido gástrico simulado
- FIS** Fluido intestinal simulado
- GLUT-4** Proteína transportadora de glicose
- GSH** Glutathiona
- HAS** Hipertensão arterial sistêmica
- HDL** Lipoproteína de alta densidade
- HMG-CoA** 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
- HPLC** High performance liquid chromatography “Cromatografia Líquida de alta eficiência”
- ICA** Anticorpos antiilhota
- IDL** Lipoproteína de densidade intermediária
- LCAT** Lecitina colesterol acetiltransferase
- LDL** Lipoproteína de densidade baixa
- LLP** Lípase lipoprotéica
- MDA** Malondialdeído
- MeOH** Metanol
- NA** Naringina

NG Naringenina

OMS Organização Mundial de Saúde

ROS Espécies reativas de oxigênio

TG Triacilgliceróis

TGI Trato gastro-intestinal

USP United States Pharmacopeia

VLDL Lipoproteína de densidade muito baixa

Resumo

Compostos bioativos se apresentam como uma fonte importante para o desenvolvimento de novos fármacos. Entre os fitofármacos, vários polifenóis (antocianinas, flavonóides e resveratrol) são utilizados na indústria farmacêutica. A naringina é um flavonóide presente em *Citrus sp.* e em medicamentos da medicina tradicional chinesa. Os flavonóides apresentam diversas atividades farmacológicas, dentre elas, propriedades antiinflamatórias, vasodilatadora, antialérgica, hipoglicemiante e redutora do colesterol. O desenvolvimento de fármacos na forma farmacêutica sólida deve levar em conta que o medicamento administrado por via oral, primeiramente precisa ser absorvido pelo estômago e intestino. A absorção de fármacos depende de sua liberação e dissolução nas condições fisiológicas e permeabilidade das membranas biológicas que necessitam transpor. No trato gastrointestinal os fármacos estão expostos a acidez do estômago e a pancreatina presente no intestino. As exposições de fármacos a essas condições podem conduzir a uma decomposição/degradação ácida ou enzimática. Neste trabalho foi realizado o desenvolvimento e avaliação biofarmacotécnica de formas farmacêuticas sólidas de naringina para a administração oral, avaliando-se a formulação e a atividade das cápsulas e comprimidos nos modelos experimentais diabéticos e hipercolesterolêmicos. No desenvolvimento farmacotécnico foi realizado: a avaliação da estabilidade gástrica da naringina, a determinação do perfil de dissolução da naringina e naringenina, e a avaliação da compatibilidade entre o fármaco e excipientes. A avaliação biofarmacotécnica foi realizada através dos testes físicos e físico-químicos descritos para formas farmacêuticas sólidas. No estudo da atividade da naringina no diabetes e na hiperlipidemia foram utilizados coelhos da raça Nova Zelândia, albinos, pesando em média 2,0 kg. A indução da diabetes foi realizada através da administração intravenosa de aloxano. Para indução da hiperlipidemia foi adicionado à dieta dos animais 1% de colesterol. Os animais foram tratados por um período de 28 dias de acordo com o grupo experimental. Em seguida realizou-se a determinação de parâmetros sanguíneos dos animais tratados e dos grupos controle. A naringina apresentou maiores taxas de solubilidade aquosa e maior percentagem de cedência do que o seu metabólito ativo naringenina. A avaliação da estabilidade da naringina, em condições fisiológicas simuladas, demonstrou que o fármaco é estável nos fluidos gastrintestinais. A análise física e físico-química realizada demonstrou que todos os lotes desenvolvidos apresentaram-se em conformidade com as especificações farmacopéicas. As cápsulas apresentaram maior percentagem de cedência da naringina, nos três meios avaliados (água, HCl 0,1M e tampão fosfato pH 6,8). Os tratamentos com naringina reduziram em até 62,66% as concentrações plasmáticas de glicose nos animais. Os dados obtidos neste trabalho demonstraram potencial antioxidante e antifúngico da naringina. A avaliação da atividade hipocolesterolemiantes permitiu concluir que os tratamentos com naringina reduziram clinicamente as concentrações plasmáticas de colesterol total e aumentaram o colesterol-HDL plasmático. A naringina se apresentou como um promissor agente com atividade hipoglicemiante e hipocolesterolemiantes. Estudos complementares, como testes toxicológicos, deverão ser realizados objetivando a disponibilização deste fitofármaco para a terapêutica de Diabetes, Dislipidemias e prevenção de aterosclerose.

Abstract

Study Biopharmaceutical of Naringin

Bioactive compounds are considered an important source for the development of new drugs. Among phytopharmaceuticals, several polyphenols (anthocyanins, flavonoids and resveratrol) are used in the pharmaceutical industry. The flavonoid naringin is present in Citrus sp. and traditional Chinese medicine. The flavonoids have several pharmacological activities, among them, anti-inflammatory properties, vasodilators, antiallergic, reduction of glucose and cholesterol. The development of drugs in solid form must take into account that the drug administered orally, must be first absorbed by the stomach and intestine. The absorption of drugs depends on their release and dissolution in physiological conditions and permeability of biological membranes that require transport. The drugs in the gastrointestinal tract are exposed to gastric acid and pancreatin in the intestine. Exposure to drugs to this conditions can lead to a breakdown / acid or enzymatic degradation. In this work was the development and evaluation of biopharmacotechniques naringin of solid dosage forms for oral administration, evaluating the activity and formulation of the tablets and capsules in hypercholesterolemic and diabetic experimental models. For the development pharmacotechniques was: assessment of gastric stability of naringin, determining the dissolution profile of naringin and naringenin, and assessing the compatibility between the drug and excipients by DSC. The biopharmacotechniques evaluation was performed through the physical tests and physical-chemical described for solid dosage forms. In the study of the activity of naringin in diabetes and hyperlipidemia were used New Zealand breed of rabbits, weighing on average 2.0 kg. The induction of diabetes was performed by intravenous administration of alloxan. For induction of hyperlipidemia was added 1% cholesterol to the diet of the animals. The animals were treated for a period of 28 days according to the experimental group. Then there was determined the blood parameters of the animals treated and control groups. The naringin showed higher rates of aqueous solubility and greater percentage of their disposal than the active metabolite naringenin. The evaluation of the stability of naringin in simulated physiological conditions showed that the drug is stable in gastrointestinal fluids. The physical analysis and physical chemistry that has made all the lots were developed in accordance with the specifications. The capsules showed a higher percentage of transfer of naringin in the three media evaluated. The treatments with naringin reduced by 62,66% plasma concentrations of glucose in animals. The evaluation of hypocholesterolemic activity has concluded that the treatments with naringin has reduced the plasma concentrations of total cholesterol and increased plasma HDL-cholesterol. The naringin is presented as a promising agent with hypoglycemic and hypocholesterolemic activity. Additional studies should be conducted, to the provision of phytopharmaceuticals for the treatment of diabetes and prevention of atherosclerosis.

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais e seus metabólitos constituíram, durante muito tempo, a base da terapêutica e, atualmente, cerca de 30% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto 50% são de origem sintética, mas relacionados aos princípios isolados de plantas medicinais. Isto se deve, em parte, à grande variedade de espécies (250-500 mil) de plantas existente na flora mundial, muitas com importantes propriedades terapêuticas (SHAN *et al.*, 2006).

Flavonóides são compostos naturais encontrados, usualmente, em verduras, leguminosas, frutas, grãos, sementes, ervas e também em bebidas como vinho e chá. São metabólitos secundários de plantas e podem ser divididos em várias classes, tais como: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis e antocianinas (OLIVEIRA *et al.*, 2004; MATSUBARA *et al.*, 2006).

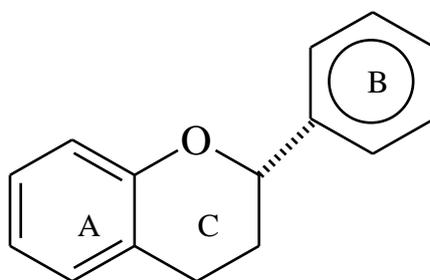


FIGURA 1: Estrutura básica dos flavonóides

Mais de 8.000 flavonóides já foram identificados e sua estrutura básica consiste em um núcleo fundamental, constituído de quinze átomos de carbonos distribuídos em três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A (FIGURA 1) (PIZZOLATTI *et al.*, 2003).

Diversos ensaios *in vivo* e *in vitro* têm mostrado a ampla variedade das atividades biológicas dos flavonóides. Já foram descritos os seguintes efeitos dos flavonóides sobre os sistemas biológicos: capacidade antioxidativa, antiinflamatória, vasodilatadora, antialérgica, antihepatotóxica, antiulcerogênica, antiplaquetária, hipoglicemiante, antimicrobiana, antiviral, bem como atividade contra o desenvolvimento de tumores (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A naringina é um flavonóide presente em diversas espécies vegetais, com potencial atividade de diminuir a taxa de glicose no sangue. Estudos demonstraram que a naringina inibe a biossíntese de eicosanóides (resposta antiinflamatória),

protege a oxidação da LDL colesterol, previne a formação de placa aterosclerótica, previne a agregação plaquetária (efeito antitrombótico), e promove relaxamento do músculo liso (efeito anti-hipertensivo). O efeito antioxidante deste flavonóide parece estar relacionado com sua ação antitrombótica. A ação antitrombótica e vasoprotetora tem sido atribuída à sua habilidade de ligar-se à membrana das plaquetas e eliminarem radicais livres (SANTOS *et al.*, 1999).

Diabetes Mellitus (DM) é considerado como problema de importância crescente na saúde pública. Sua incidência e prevalência estão aumentando, alcançando proporções epidêmicas. Está associado a complicações que comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos. Além disso, acarreta altos custos para o seu controle metabólico e tratamento de suas complicações.

O DM situa-se entre as dez principais causas de morte nos países ocidentais e, apesar dos progressos em seu controle clínico, ainda não foi possível controlar de fato suas consequências letais (NEGRI, 2005).

O DM é uma entidade patológica caracterizada por distúrbios do metabolismo intermediário, especialmente de carboidratos, levando ao aumento nos níveis séricos de glicose, a complicações metabólicas agudas potencialmente fatais, bem como uma série de complicações crônicas multisistêmicas. É uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou incapacidade da insulina exercer adequadamente seus efeitos. Caracteriza-se pela hiperglicemia crônica, frequentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial. O DM se caracteriza por estado de hipoinsulinismo absoluto ou relativo. O metabolismo celular funciona como se o paciente estivesse constantemente em estado de jejum, apesar de alimentado (BELTRAME *et al.*, 2001).

A Dislipidemia, o DM e Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) são considerados importantes fatores no desenvolvimento da doença arterial coronariana, a principal causa de morte de indivíduos adultos no mundo (LIMA *et al.*, 2005).

A hipercolesterolemia é fator de risco para doenças cardiovasculares. E, as doenças cardiovasculares são as causas de mortalidade mais importantes em grande número de países desenvolvidos e em desenvolvimento. Sua evolução crônica pode

trazer ao organismo complicações tais como aterosclerose, que pode provocar *angina pectoris*, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) e outras afecções renais e hepáticas (SOARES *et al.*, 2005).

Os lípides são grupos heterogêneos de compostos relacionados com ácidos graxos que possuem a propriedade de ser relativamente insolúvel em água e solúvel em solventes apolares. Os seguintes lípides são importantes para o ser humano: ácidos graxos, triacilgliceróis (TG) e fosfolípides. O colesterol, considerado como lípidos, é um álcool monoídrico não saturado da classe dos esteróides (ARCANJO *et al.* 2005).

O colesterol pode-se apresentar sob a forma livre ou esterificada (ésteres de colesterol), não sendo encontrado nos vegetais. É indispensável na estrutura das membranas celulares, é o precursor de hormônios esteróides, ácidos biliares e vitamina D. Apesar de realizar funções indispensáveis ao organismo, ele se torna nocivo quando está em excesso e sua concentração no sangue se encontra elevada (ARCANJO *et al.*, 2005).

A Dislipidemia é caracterizada por concentrações anormais de lipídeos ou lipoproteínas no sangue, que é determinada por fatores genéticos e ambientais. Entre as desordens metabólicas lípidicas, a aterosclerose é uma das que provocam lesões e podem levar ao óbito. É uma cardiopatia coronária que tem como fatores de risco a idade, sexo, obesidade, estresse emocional, baixos níveis de HDL, fumo, dietas ricas em gordura saturada e ainda predisposição genética. Neste processo, ocorre injúria do endotélio provocada pela oxidação do LDL (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A maior parte das substâncias usadas na prática farmacêutica encontra-se no estado sólido. Estas são processadas para a obtenção de diversas formas de apresentação, tais como, cápsulas e comprimidos (AGUIAR *et al.*, 2005).

As cápsulas podem ser definidas como preparações farmacêuticas constituídas por invólucro de natureza, forma e dimensões variadas, contendo substâncias medicinais sólidas, pastosas ou líquidas. Os invólucros das cápsulas são preparados com gelatina, adicionados ou não de substâncias emolientes, como a glicerina ou sorbitol, os quais modificam a sua consistência. Atualmente, as cápsulas gelatinosas duras são consideradas uma das melhores formas de acondicionar substâncias

medicamentosas, pois as protegem da ação da luz, do ar e da umidade. São facilmente administradas e apresentam grande precisão de dosagem. As substâncias medicamentosas administradas sob a forma de cápsulas gelatinosas orais são rapidamente liberadas em contato com o suco gástrico. (PRISTA, 1995).

Os comprimidos são formas farmacêuticas sólidas contendo princípios ativos, geralmente, preparadas com os excipientes adequados. Eles podem variar em tamanho, forma, peso, dureza, espessura, características de desintegração, além de outros aspectos. A maioria dos comprimidos é administrada por via oral e podem conter corantes e revestimentos. São produzidos por compressão, possuindo além do princípio ativo, vários excipientes, como diluentes ou espessantes; aglutinantes ou adesivos; agentes desintegrantes; antiaderentes, deslizantes, lubrificantes; e excipientes diversos (PRISTA, 1995).

O desenvolvimento de fármacos na forma farmacêutica sólida deve levar em conta que o medicamento administrado por via oral, primeiramente precisa ser absorvido pelo estômago e intestino. A absorção de fármacos, a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral (FFSO), depende de sua liberação e dissolução nas condições fisiológicas e permeabilidade das membranas biológicas que necessitam transpor. Qualquer fator que altere os processos de desagregação e dissolução poderá afetar diretamente a velocidade do processo de absorção (QUENTAL *et al.*, 2006; AGUIAR *et al.*, 2005; CAIAFA *et al.*, 2002).

As FFSO empregadas com a finalidade de obter-se ação sistêmica, potencialmente, geram problemas de biodisponibilidade em função dos aspectos ligados à formulação e os processos de fabricação. Para exercer efeito terapêutico, é necessário que as moléculas dos fármacos sejam dissolvidas nos fluídos gastrintestinais e, dessa forma, estejam disponíveis para absorção. Embora os adjuvantes farmacotécnicos sejam considerados inertes, do ponto de vista farmacológico, podem exercer influência significativa na liberação do fármaco (MALESUK *et al.*, 2006).

Os ensaios de dissolução *in vitro* constituem um dos instrumentos mais sensíveis para avaliação das propriedades biofarmacotécnicas das preparações sólidas orais. O perfil de dissolução relaciona a porcentagem de fármaco dissolvido em função do

tempo e representa uma técnica para avaliar formas farmacêuticas sólidas antes do teste clínico. Permite, também, a obtenção de parâmetros cinéticos, que são importantes para determinar a velocidade e eficiência do processo, além do tempo necessário para que determinadas percentagens do fármaco se dissolvam, possibilitando, desta forma, conclusões a respeito das características biofarmacotécnicas *in vitro* da determinada formulação (MANADAS *et al.*, 2002).

Referências

1. AGUIAR, G.; FARIA, L.G.; FERRAZ, H.G.; SERRA, C.H.R. *Avaliação biofarmacotécnica in vitro de formas farmacêuticas sólidas contendo doxiciclina. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41: 452-457, 2005.
2. ARCANJO, C.L.; PICCIRILLO, L.J.; MACHADO, I.V.; ANDRADRE, C.R.M.; CLEMENTE, E.L.; GOMES, M.B. *Avaliação de dislipidemia e índices antropométricos de pacientes com diabetes mellitus tipo 1. Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*, 49: 951-958, 2005.
3. BELTRAME, F.L.; SARTORETTO, J.L.; BAZOTTE, R.B.; CUMAN, R.N.; CORTEZ, D.A.G. *Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do Cissus sicyoides L. Química Nova*, 24:783-785, 2001.
4. CAIAFA, M.C.; OLIVEIRA, D.O.; PINHEIRO, V.P.; GUERRA, M.O.; PINHO, J.J.R. *Estudo biofarmacotécnico de cápsulas de amoxicilina. Análise comparativa de produtos industrializados e magistrais. Cinética de dissolução. Revista Lecta*, 20(1): 77-90, 2002.
5. LIMA, L.M.; CARVALHO, M.G.; SOARES, A.L.; LASMAR, M.C.; NOVELLIS, B.A.; SOUZA, M.O. *Correlação entre os níveis plasmáticos de apolipoproteínas A-I e B e o perfil lipídico em indivíduos com e sem diabetes mellitus tipo 2 e hipertensão arterial. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 41(2):411-417, 2005.
6. MALESUK, M.G.; CARDOSO, S.G.; LANSANOVA, F.A. *Desenvolvimento de teste de dissolução e estudo comparativo de comprimidos e cápsulas magistrais contendo anlodipino. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 27:37-49, 2006.
7. MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. *A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38:375-396, 2001.
8. MATSUBARA, S.; AMAYA, D.B.R.; *Conteúdo de Mircetina, Quercetina e Kaempherol em chás comercializados no Brasil. Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(2):380-385, 2006.

9. NEGRI, G. *Diabetes mellitus: plantas e princípios ativos hipoglicemiantes*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 41(2):121-142, 2005.
10. OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; LOPES, R.M.; MORAES, G.H.K.; FERREIRA, D.B.; SILVA, R.R.; MAIA, J.R.S. *Efeito de diferentes doses de rutina sobre lipídeos no soro de coelhos machos e fêmeas*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 36(4):213-215, 2004.
11. PIZZOLATTI, M.G.; CUNHA, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUZA, E. *Flavonoids glycosides from leaves and flowers of Bauhinia forficata (legumonisae)*. **Química Nova**, 26(4):466-469, 2003.
12. PRISTA, L.N.; CORREIA, A.A.; MORGADO, R.. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 11: 1391-1395, 1995.
13. QUENTAL, C.; SALLES, S. *Ensaio clínico: capacitação nacional para avaliação de medicamentos e vacinas*. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 09: 408-424, 2006.
14. SANTOS, K.F.R.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; OLIVEIRA, M.G.A. *Hypolipidaemic effects of naringenin, rutin, nicotinic acid and their associations*. **Pharmacological Research**, 40(6): 41-46, 1999.
15. SHAN, J.J.; YANG, M.; REN, J.W. *Anti-diabetic and hypolipidemic effects of Aqueous – extract from the flower of Inula japonica in alloxan-induced diabetic mice*. **Biol. Pharm. Bull**, 29(3): 455-459, 2006.
16. SOARES, D.; MARTHENDAL, M.C.Z.; ZENI, A.L.B. *Study of rats lipidic levels after treatment with infusion of some folk medicinal plants*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, 86(2): 71-74, 2005.

2 NARINGINA, DIABETES MELLITUS E DISLIPIDEMIA

2.1 Introdução

Estudos epidemiológicos mostram relação entre o consumo de alimentos de origem vegetal e uma gama de benefícios à saúde. Estes têm sido associados, pelo menos parcialmente, a alguns constituintes fitoquímicos, em particular, aos polifenóis. Nos últimos anos, nutracêuticos têm surgido no mercado, em diversas formas farmacêuticas (ESPÍN *et al.*, 2007).

Esses compostos bioativos se apresentam como uma fonte importante para o desenvolvimento de novos fármacos. Entre os fitofármacos, vários polifenóis (antocianinas, flavonóides, resveratrol e ácido elágico) são utilizados na indústria farmacêutica. A investigação científica incentiva às pesquisas com alimentos e fitoconstituintes, principalmente, porque se observa que muitos nutracêuticos comercializados, são produtos com poucos ou duvidosos fundamentos científicos. Parâmetros como biodisponibilidade, metabolismo, dose/ resposta e toxicidade de muitos desses compostos ainda não estão esclarecidos.

Pesquisas desenvolvidas por diversas indústrias farmacêuticas têm demonstrado uma crescente demanda por novas alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças crônicas, especialmente, as relacionadas com o envelhecimento. Princípios ativos extraídos de fontes alimentares têm sido utilizados para tratamento de doenças cardiovasculares, DM e alguns tipos de câncer.

Neste contexto, os flavonóides têm recebido destaque. São metabólitos secundários polifenólicos, biossintetizados a partir das vias do acetato e do chiquimato, ocorrem naturalmente em várias plantas e frutos como glicosídeos, ou menos frequentemente, agliconas. A grande diversidade dos flavonóides é decorrente das variações estruturais devidas a diferentes níveis de oxidação, tais como, flavonas, flavononas, flavonóis, diidroflavonóis, antocianidinas e isoflavonas (ZUANAZZI, 1991; MANN, 2001; HAVSTEEN, 2002).

Os flavonóides têm uma função importante na formação de pigmentos das plantas, na proteção contra luz ultravioleta, na interação simbiótica ou patogênica planta-microrganismo e na interação entre plantas parasíticas (CROTEAU *et al.*, 2000).

Estudos *in vivo* e *in vitro* vêm comprovando a ampla variedade das atividades farmacológicas dos flavonóides, destacando-se a rutina, apigenina, artemetina, quercetina, morina, genisteína, naringina e naringenina. A naringenina reúne atividades indutora da formação de hemoglobina, antiespasmódico e anti-hepatotóxico. A artemetina é utilizada como antiinflamatório, antimicrobiano e diurético. A genisteína, presente na soja, reduz a incidência de câncer de mama e próstata em humanos. Associações entre naringina/ antocianina e naringina/carmim foram altamente eficientes na redução dos níveis de colesterol e triacilglicerol (HAVSTEEN, 2002; LOPES *et al.*, 2000).

Recentemente tem-se procurado estabelecer uma correlação entre a ingestão de flavonóides e a incidência de patologias como doenças coronarianas e oncológicas. Evidências epidemiológicas correlacionam elevado consumo de flavonóides com menor risco de desenvolvimento de tumores, em concordância com estudos *in vitro* evidenciando a capacidade de determinados flavonóides de inibir a carcinogênese (HAVSTEEN, 2002).

Experimentos realizados em ratos mostraram que flavonóides apresentaram efeito na redução nos níveis sanguíneos de colesterol total e triacilgliceróis. Este efeito pode ser explicado, em parte, pelo aumento da atividade da enzima LCAT, enzima presente na superfície das HDL, que converte o colesterol presente em quilomícrons, VLDL, LDL e tecidos periféricos em ésteres de colesterol, transportando-os para o fígado para serem metabolizados, reduzindo assim os níveis de colesterol sanguíneo; e pelo aumento da atividade da enzima lipase lipoprotéica, que remove os ácidos graxos dos triacilgliceróis presentes em quilomícrons e VLDL para o tecido adiposo, resultando numa redução dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis. Observou-se também neste experimento o aumento nos níveis de ácidos biliares hepáticos e fecais, bem como esteróis neutros fecais, indicando uma alta taxa de degradação de colesterol e redução na reabsorção intestinal de ácidos biliares (SUDHEESH *et al.*, 1997).

Apesar de todas as potencialidades dos flavonóides, deve-se considerar que a maioria dos estudos sobre suas propriedades tem avaliado a forma aglicona. Entretanto, grande parte dos flavonóides presentes na dieta encontram-se na forma glicosilada. Outra informação a se considerar, é a pouca informação existente sobre a

absorção e biodisponibilidade dos flavonóides em humanos. Esses compostos são geralmente absorvidos na forma aglicona após sofrerem hidrólise no trato digestivo. Os flavonóides são ainda extensivamente metabolizados, por conjugação ou oxidação (RICE-EVANS, 2004).

Naringina e naringenina (FIGURA 2), flavonóides de *citrus sp*, produtos químicos funcionais, demonstraram em diversos estudos ter potencial anti-oxidante, propriedades antiinflamatórias, anti-trombóticas, antialérgicas, vasodilatadora, hipoglicemiante e redutora do colesterol.

2.2 Naringina

A naringina (4,5,7-trihidroxi-7-rhamnonglucosil-flavanona) é um flavonóide presente em muitas espécies de *Citrus sp*. e em medicamentos da medicina tradicional chinesa. Como a maioria dos flavonóides, apresenta diversas atividades farmacológicas. Alguns estudos demonstraram que esse fármaco pode ser administrado por via oral e que no trato gastrointestinal é metabolizado, sendo a naringenina seu principal metabólito. Naringenina, a forma aglicona da naringina, também apresenta atividade farmacológica, destacando-se o seu efeito antioxidante e inibidor da proliferação de câncer de mama (FANG *et al.*, 2006).

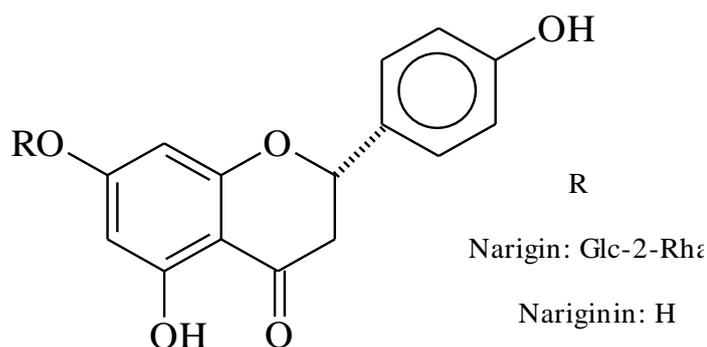


FIGURA 2: Estrutura química da naringina e naringenina.

As flavanonas ocorrem quase exclusivamente em citrus. As concentrações mais elevadas são encontradas nos frutos. Hesperidina, naringina e naringenina são os principais flavonóides das laranjas e mandarinas. A naringenina também é encontrada em tomates frescos (ERLUND, 2004).

A naringina é o principal flavonóide presente no *grapefruits* e representa até 10% do seu peso seco. É responsável pelo sabor amargo das frutas cítricas. Recentes estudos em seres humanos demonstraram os efeitos do sumo de toranja sobre a oxidação lipídica e como bloqueador dos canais de cálcio. A naringenina e o sumo de toranja apresentaram capacidade de inibir o citocromo P-450 e atividade em microsomas hepáticos humanos (ISHII *et al.*, 1997; RIBEIRO & ISABEL, 2008b).

Os flavonóides cítricos agem como varredores de radicais livres. Têm capacidade analgésica, imunomoduladora, antimicrobiana, anti-diarréico, antitrombótica, de modular a atividade enzimática e de inibir a proliferação celular (RIBEIRO *et al.*, 2008).

A naringenina tem se apresentado potencialmente útil como antineoplásico, hipoglicemiante e no tratamento ou prevenção da aterosclerose, com inúmeras atividades anti-aterogênicas, tais como, antioxidante, antitrombótico e vasodilatador (RIBEIRO & ISABEL, 2008b).

Os flavonóides são metabolizados no lúmen gastrointestinal, nas células da parede intestinal e no fígado. No intestino, os flavonóides glicosilados sofrem hidrólise por ação das enzimas β -glucosidase e α -rhamnosidase (FIGURA 3) produzida por bactérias gastrintestinais (*Streptococcus faecum*, *Streptococcus sp* e *Escherichia coli*). A absorção ocorre no intestino delgado e no intestino grosso (ERLUND, 2004).

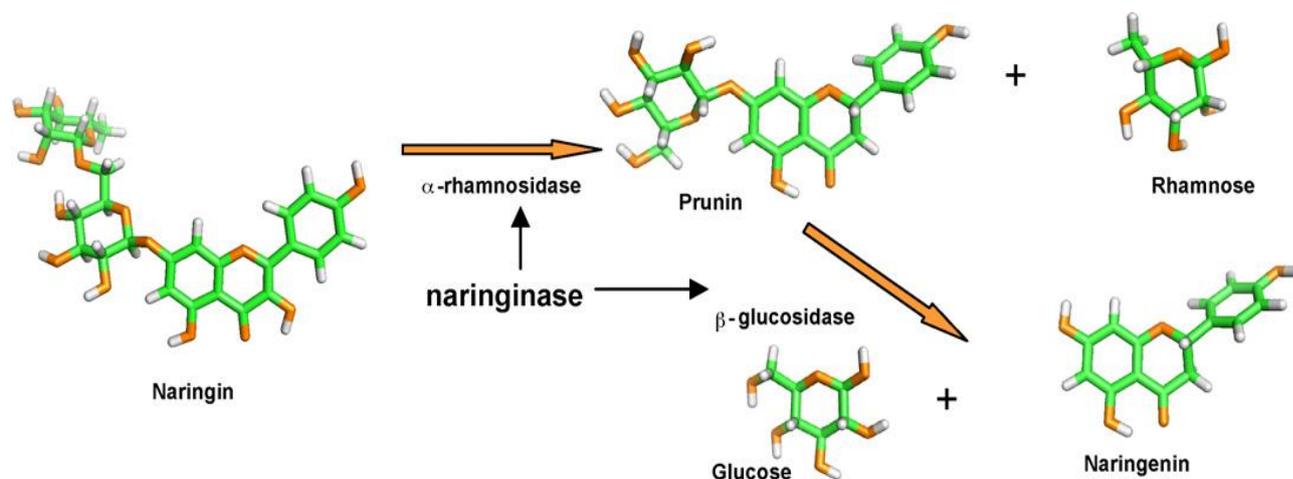


FIGURA 3: Hidrólise da naringina em prunina, rhamnose, naringenina e glicose.

FONTE: RIBEIRO & ISABEL, 2008a.

Hsiu *et al.* (2002) realizaram um estudo para avaliar os parâmetros farmacocinéticos das flavanonas naringina e naringenina. Em seu trabalho, administraram os fármacos por via intravenosa e oral. Os resultados demonstraram que a biodisponibilidade oral da naringenina foi de apenas 4%, o que pôde ser explicado em função da baixa solubilidade aquosa desse flavonóide. A naringina apresentou biodisponibilidade superior. Após sua administração por via oral, foi possível quantificar no sangue, tanto a forma glicona quanto a aglicona, sendo a última em quantidade superior a detectada, após a administração de naringenina. Isso deve, ao fato da naringina ser metabolizada pelas enterobactérias para sua forma aglicona, antes da absorção.

A excreção dos flavonóides cítricos é principalmente renal. Estudos revelaram que a recuperação urinária da naringina foi de cerca de 60%, e sua meia-vida foi estimada em 2,6 horas (ERLUND, 2004).

A maioria dos estudos recentes sobre tratamento de diabetes tipo 2 concentram-se no potencial uso de plantas medicinais com efeitos hipoglicemiantes e hipolipemiantes. Pesquisas com hesperitina e naringina demonstrou que esses flavonóides não tem efeitos colaterais em seres humanos. Recentemente, o efeito redutor de lipídios e glicose e a capacidade antioxidante foram observados após a administração de naringina 400 mg/dia, durante 8 semanas, em indivíduos hipercolesterolêmicos. Além disso, a naringina e a naringenina tem demonstrado exercer efeito no transporte de glicose e sobre o receptor de insulina, que desempenham papéis fundamentais na diabetes (JUNG *et al.*, 2006).

Oliveira *et al.* (2002a) relataram que a redução dos níveis de glicose sanguínea em animais tratados com naringenina foi de 16,05%, correspondendo a um valor de 78,3 mg/dL no período de 27 dias. Levando em conta o efeito farmacológico, esta variação em um indivíduo diabético, se mostra altamente relevante.

Nagem *et al.* (1999) demonstraram os efeitos de naringina e dos corantes naturais antocianina e carmim no metabolismo lipídico. Os resultados obtidos para colesterol total e triacilglicerol foram 63,11% menores nos animais tratados com naringina + carmim e o HDL apresentou uma elevação de 15,27%. A rutina, naringina, naringenina e a quercetina na dose de 5mg foram eficazes na redução do colesterol

total. Na dose de 10 mg/dia a naringina e a naringenina foram responsáveis pela redução nos níveis séricos de colesterol de coelhos em 54,03% e 49,34%, respectivamente (OLIVEIRA *et al.*, 2002b).

A maioria dos seres humanos está exposta a flavonóides diariamente e, portanto, o seu impacto a saúde é de grande importância. Estudos farmacológicos devem ser realizados com objetivo de se conhecer as aplicações terapêuticas e de se desenvolver medicamentos a partir desses fármacos.

2.3 Diabetes Mellitus

Diabetes *Mellitus* (DM) caracteriza-se por distúrbio metabólico, determinado geneticamente, associado com deficiência absoluta ou relativa de insulina e que na sua expressão clínica completa é caracterizado por situações metabólicas e complicações vasculares e neuropáticas. O componente metabólico é caracterizado pela hiperglicemia e por alterações no metabolismo de proteínas e lipídios. O componente vascular é constituído por macroangiopatia inespecífica (aterosclerose e suas manifestações clínicas) e pela microangiopatia diabética, a qual afeta particularmente a retina, o rim e os nervos periféricos.

A incidência do diabetes é igual entre os homens e as mulheres na maioria das faixas etárias, mais é ligeiramente maior nos homens acima de 60 anos. A mortalidade é 2-3 vezes superior nos indivíduos cujo diagnóstico é feito depois dos 40 anos. No Brasil, a prevalência entre a população entre 60 e 69 anos é de 19,4%. Projeções apontam que, em 2030, o número de pessoas com 65 anos e mais afetadas pela doença será maior que 48 milhões em países desenvolvidos e 82 milhões em países em desenvolvimento. (HARRISON, 2002; WILD *et al.*, 2004).

Estima-se que no Brasil existam sete ou oito milhões de indivíduos portadores de diabetes, dos quais metade desconhece o diagnóstico. Desse total, 90% são do tipo 2, 8% a 9% do tipo 1, de origem auto-imune e 1% a 2% secundário ou associado a outras síndromes. No país é bastante elevada a incidência de complicações crônicas (distúrbio visual, cegueira, hipertensão, nefropatia, amputação de membros, impotência sexual, distúrbios cardiocirculatórios e vasculares cerebral) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

2.3.1 Fisiopatologia da Diabetes

No adulto o pâncreas endócrino é constituído de cerca de 1 milhão de ilhotas de Langherans distribuída por toda a glândula. No interior das ilhotas, existem quatro tipos de células produtoras de hormônios. Os produtos hormonais incluem: a insulina, o hormônio anabólico e de armazenamento do organismo; o glucagon, o fator hiperglicemiante que mobiliza as reservas de glicogênio; a somatostatina, inibidor universal das células secretoras; e o peptídeo pancreático, uma pequena proteína que facilita os processos digestivos (EXPERT COMMITTEE, 2002).

Os níveis elevados de glicemia associado ao DM resultam da secreção pancreática inadequada de insulina ou de sua ausência, com ou sem comprometimento de sua ação. Na atualidade, o diabetes é classificado em quatro categorias (QUADRO 1) (EXPERT COMMITTEE, 2002).

QUADRO 1: Classificação etiológica do diabetes

Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	diabete-insulino-dependente
Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	diabete-não-insulino-dependente
Diabetes tipo 3	outros tipos específicos
Diabetes tipo 4	diabete gestacional

O DM tipo 1 caracteriza-se basicamente pela destruição seletivas das células β e por deficiência grave ou absoluta de insulina. A maioria dos casos surge antes dos 30 anos de idade, entretanto, pode surgir em qualquer faixa etária. É subdividido em causas auto-imune e idiopáticas. Fatores ambientais desconhecidos precipitariam o processo auto-imune específico contra as células β do pâncreas, produtoras de insulina. A destruição dessas células podem ser rápidas nos mais jovens ou lenta e progressiva, podendo levar anos, como nos adultos. O componente humoral desse processo auto-imune leva a produção de anticorpos contra as ilhotas, que são marcadores periféricos desse processo.

Os anticorpos antiilhotas (ICA), anticorpos antiinsulina (AAI), anticorpos contra a descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD) e anticorpos antitirosina peroxidase

(anti-IA2) podem estar presentes, até mesmo antes das manifestações metabólicas. Quando os sintomas do diabetes se manifestam a destruição ainda não é total, mas é suficientemente grave para requerer tratamento insulínico. Um ou mais desses anticorpos estão presentes no soro de cerca de 90% dos pacientes por ocasião do diagnóstico. Alguns anos após, a destruição é completa, levando ao quadro de diabetes dependente de insulina exógena (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2002).

O diabetes tipo 2 caracteriza-se por resistência tecidual à ação da insulina, juntamente com deficiência relativa na secreção do hormônio. O indivíduo pode apresentar maior resistência ou maior deficiência das células β , e as anormalidades observadas podem ser discretas ou graves. Apesar da produção de insulina pelas células β nesses pacientes, o hormônio é inadequado para superar a resistência e ocorre elevação do nível de glicemia. O comprometimento na ação da insulina também afeta o metabolismo de lipídios, resultando em aumento no fluxo de ácidos graxos livres e nos níveis de triglicerídios e, de maneira recíproca, em baixos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL). Esse tipo compreende o conjunto de distúrbios que apresentam em comum a presença de hiperglicemia e graus variados de complicações crônicas.

Em aproximadamente 90% dos casos está associado à obesidade, apresenta alterações na primeira fase de secreção de insulina e nos primeiros anos exibe estado de hiperinsulinemia e hiperglicemia (resistência insulínica). Após cinco ou dez anos de evolução, a secreção de insulina pela célula β diminui, podendo haver a hipoinsulinemia absoluta ou relativa.

O diabetes tipo 2 pode ser assintomático no início e o diagnóstico se estabelece pela dosagem de glicemia. A prevalência aumenta com a idade, obesidade, dislipidemia e história familiar para diabetes; é fortemente associado com doença cardiovascular e hipertensão. A morbidade e a mortalidade decorrem principalmente da macroangiopatia (doença vascular aterosclerótica) e de suas diferentes manifestações: doença coronariana, acidente vascular cerebral e insuficiência vascular periférica.

A designação diabetes tipo 3 refere-se a múltiplas outras causas específicas de elevação da glicemia: doenças não-pancreáticas, terapia farmacológica, defeitos genéticos na função das células β , defeitos genéticos na ação da insulina, doença do

pâncreas exócrino, infecções e formas incomum de diabetes imunomediado. (EXPERT COMMITTEE, 2002).

O diabetes gestacional (tipo 4) refere-se a qualquer anormalidade dos níveis de glicose observada pela primeira vez durante a gravidez. Durante a gravidez a placenta e os hormônios placentários criam uma resistência à insulina, que se torna mais pronunciada no último trimestre.

2.3.2 Quadro Clínico

A DM caracteriza-se por hiperglicemia crônica, frequentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial. Os pacientes apresentam os sintomas de poliúria, polidipsia, polifagia e astenia (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2002).

A hiperglicemia persistente está vinculada a danos, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006).

Nos pacientes diabéticos as conseqüências a longo prazo decorrem de alterações micro e macrovasculares. Estas complicações crônicas incluem nefropatia, com possível evolução para insuficiência renal, retinopatia, com a possibilidade de cegueira e/ ou neuropatia, com risco de úlceras nos pés, amputações, artropatia e manifestações de disfunção autonômica, incluindo disfunção sexual. A DM também está associada ao risco aumentado de disfunção miocárdica, causando múltiplas alterações estruturais no coração, como apoptose, diminuição do contato intercelular e deformação nas estruturas contráteis (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2002; DYNTAR *et al.*, 2006).

A DM está relacionada a distúrbios no crescimento tecidual que pode ser devido à hiperglicemia crônica e alterações metabólicas. Clinicamente, é observado hepatomegalia em pacientes diabéticos jovens e adultos. O aumento no crescimento celular está relacionado ao aumento no número de células (hiperplasia), aumento no tamanho celular (hipertrofia) e morte celular (apoptose). São observados hipertrofia renal, hipertrofia vascular e hiperplasia intestinal. A hiperglicemia também afeta a proteína kinase que controla a mitose celular (HERRMAN *et al.*, 1999).

A elevação nos níveis dos marcadores de injúrias hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) estão associados com risco de incidência de DM tipo 2 (HANLEY *et al.*, 2004; LESSA, 2004).

2.3.3 Tratamento do Diabetes Mellitus

O tratamento do DM inclui as seguintes estratégias: educação; modificações do estilo de vida, que inclui suspensão do fumo, aumento da atividade física e reorganização do hábitos alimentares; e se necessário uso de medicamentos.

2.3.3.1 Insulina

A insulina, proteína com 51 aminoácidos dispostos em duas cadeias (A e B) unidas por pontes de dissulfeto. Existem diferenças nos aminoácidos de ambas as cadeias de acordo com cada espécie. A insulina é liberada das células β do pâncreas em baixa taxa no estado basal e numa taxa muito mais alta no estado estimulado, em resposta a uma variedade de estímulos, em particular glicose. O fígado e o rim são os dois órgãos principais que removem a insulina da circulação.

Após penetrar na circulação, a insulina liga-se a receptores especializados presentes nas membranas da maioria dos tecidos. Os receptores ligam-se à insulina com alta especificidade e afinidade, em quantidades da ordem de picomolares. A insulina promove o armazenamento de glicose e insulina no interior das células-alvo especializadas e influencia o crescimento celular e as funções metabólicas de uma ampla variedade de tecidos.

As preparações comerciais de insulina diferem em vários aspectos, incluindo diferenças nas técnicas de produção de DNA recombinante, seqüência de aminoácidos, concentração, solubilidade e tempo de início e duração de sua ação biológica. O modo padronizado de insulino terapia consiste em injeção subcutânea com agulhas e seringas convencionais, existem estudos clínicos em andamento para avaliar a segurança e a eficácia de pó fino e outras formas de administração.

O tratamento com insulina está indicado ao grupo de pacientes que praticamente não têm nenhuma secreção de insulina (diabetes tipo 1) e cuja sobrevivência depende da administração da insulina exógena. O principal efeito adverso da insulina é a eventual

ocorrência de hipoglicemia. Outros efeitos incluem: lipodistrofia, alergia e resistência imune à insulina.

2.3.3.2 Fármacos Antidiabéticos Orais

Recomenda-se a utilização de hipoglicemiantes orais quando não se consegue atingir os níveis glicêmicos desejáveis após a adoção das alterações dietéticas e práticas de exercícios físicos. Quando a mudança no estilo de vida não estabiliza a glicemia, parte-se para a monoterapia variável de acordo com o estado do paciente. A resposta inadequada leva a necessidade de acrescentar um segundo ou até um terceiro agente, podendo ser este a própria insulina.

Os antidiabéticos de uso oral são classificados em cinco classes, cujo mecanismo de ação está resumido na Quadro 2.

QUADRO 2 Classificação dos hipoglicemiantes de uso oral e mecanismo de ação

Classe farmacológica	Mecanismo de ação
Sulfoniuréias	Aumenta a secreção de insulina pelo pâncreas
Biguanidas	Aumenta o efeito periférico da insulina (fígado)
Glinidas	Aumento da secreção de insulina
Tiazolidinedionas	Aumento do efeito periférico da insulina (músculo)

As sulfoniuréias foram os primeiros hipoglicemiantes de uso oral introduzidos no mercado. Estes fármacos agem estimulando diretamente a secreção basal de insulina pelas células β pancreáticas. Foram propostos mecanismos adicionais de ação – redução dos níveis séricos de glucagon e fechamento dos canais de potássio nos tecidos extra-pancreáticos. Todas as sulfoniuréias reduzem a glicemia em 20%. São drogas preferidas em pacientes DM tipo 2 não obesos com glicemia de jejum entre 160-270mg/dL (aquelas em que predomina a disfunção das células β em relação à resistência periférica a insulina). A tolbutamida é bem absorvida, porém rapidamente metabolizada no fígado. A duração do efeito é relativamente curta, com meia vida de

eliminação de 4-5 horas; trata-se da sulfoniluréia mais segura para tratamento de idosos. A clorpropamida, cuja meia-vida é de 32 horas, é metabolizada lentamente no fígado a produtos que conservam alguma atividade biológica. Seu uso é contraindicado a pacientes com disfunção hepática ou renal. As doses acima de 500mg/ dia aumentam o risco de icterícia. Os efeitos colaterais incluem rubor após o consumo de álcool. A tolazalamida é comparável à clorpropamida na sua potencia, porém possui duração de ação mais curta.

A metformina é a única biguanida disponível ao uso clínico. A sua ação é a diminuição da resistência periférica a insulina (especialmente no fígado), reduzindo principalmente a produção hepática de glicose. O seu mecanismo de ação é desconhecido. É o fármaco indicado a pacientes obesos com glicemia de jejum entre 170-270 mg/dL. A metformina possui meia-vida de 1,5-3 horas, não se liga às proteínas plasmáticas, não é metabolizada e é excretada pelos rins na forma do composto ativo. A dose varia de 500 mg até uma quantidade máxima de 2,55 g ao dia, sendo recomendado a menor dose eficaz. Os efeitos tóxicos mais frequentes são gastrintestinais (anorexia, náusea, vômitos, desconforto abdominal, diarreia) e ocorrem em até 20% dos pacientes.

As glinidas constituem uma classe relativamente nova de segretagogos de insulina. A repaglinida modula a liberação de insulina pelas células β ao regular o efluxo de potássio através dos canais de potássio. Apresenta início de ação muito rápido, com concentração máxima e efeito máximo dentro de aproximadamente 1 hora após a ingestão. A duração de ação é de 5-6 horas. O fármaco deve ser administrado imediatamente antes de cada refeição, em doses de 0,25-4mg (dose máxima, 16 mg/dia). Existe risco de hipoglicemia se a refeição for adiada ou omitida, ou se tiver conteúdo inadequado de carboidratos.

As tiazolidinedionas atuam ao diminuir a resistência à insulina. Sua ação primária consiste na regulação nuclear dos genes envolvidos no metabolismo da glicose, dos lipídeos e da diferenciação dos adipócitos. A rosiglitazona é agonista altamente seletivo. Esse fármaco melhora a sensibilidade à insulina devido à captação da glicose nos tecidos por meio da proteína transportadora da glicose, GLUT-4. É metabolizada pelo fígado a metabólitos com atividade mínima. É administrada uma ou duas vezes ao dia, sendo a dose total habitual 4-8 mg. Como seu mecanismo de ação envolve a

regulação gênica, as tiazolidinedionas apresentam início e término lento de sua atividade, no decorrer de semanas ou até mesmo meses.

2.4 Dislipidemia

Dislipidemias são alterações dos níveis plasmáticos de lipídeos acima ou abaixo do intervalo normal. Os níveis reduzidos de HDL-colesterol e as hiperlipidemias (hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia) apresentam relevância clínico-epidemiológica por constituírem os principais fatores para doença aterosclerótica, especialmente a doença arterial coronariana (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2003).

A doença arterial coronariana é a principal causa de mortalidade nos Estados Unidos, onde aproximadamente 12,9 milhões de pessoas apresentam o diagnóstico. No Brasil, as doenças cardiovasculares são também responsáveis pelas maiores taxas de mortalidade. Em 2003 ocorreram cerca de 233.000 óbitos secundário a doenças cardiovasculares (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2003; DATASUS, 2003).

Atualmente as doenças cardiovasculares representam uma das principais causas de morbi-mortalidade, no mundo ocidental, sendo responsáveis por mais de 30% de todas as mortes, seguidas pelo câncer e doenças respiratórias. De acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS, o aumento na incidência de doenças cardiovasculares tende a persistir, agravando as condições de saúde dos países desenvolvidos e em desenvolvimento (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

Diversos indicadores de saúde apresentam as doenças cardiovasculares como uma das principais causas de aposentadorias e internações. Em 2000, foram responsáveis pela movimentação financeira de recursos públicos de aproximadamente, 900 milhões de dólares em hospitalização no Brasil. As doenças do sistema circulatório constituem a principal causa de óbito (32%), sendo as doenças isquêmicas do coração responsáveis por até 80% dos episódios de morte súbita (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Um em cada cinco brasileiros tem concentração de colesterol total acima de 200 mg/dL, ou seja, cerca de 38,9 milhões de pessoas tem colesterol classificado como limítrofe ou alto (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

Assim como a hipertensão, a dislipidemia está bastante associada ao DM. O diabetes dobra o risco de doença cardiovascular em homens e triplica em mulheres. Aproximadamente 13% dos homens com DM e hipercolesterolemia acima de 65 anos já tiveram episódio de acidente vascular cerebral (AVC). Indivíduos diabéticos apresentam o dobro de risco de morrer por causas cardiovasculares quando comparados à população em geral (SIQUEIRA *et al.*, 2007).

2.4.1 Fisiopatologia da Hiperlipidemia

As lipoproteínas são partículas com regiões centrais hidrofóbicas contendo ésteres de colesterol e triglicerídeos. O núcleo é circundado por colesterol não-esterificado, fosfolípidos e apoproteínas. As principais lipoproteínas são originadas no fígado, no intestino ou em ambos. Os quilomícrons (QM) provêm do intestino e tem como função principal o transporte das gorduras da dieta. A VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa) é originada no fígado, e seu metabolismo periférico resulta em IDL (lipoproteína de densidade intermediária) e LDL (lipoproteína de densidade baixa). Essas partículas são responsáveis pelo transporte dos triacilgliceróis e do colesterol produzido pelo fígado. A HDL (lipoproteína de densidade alta) é produzida pelo fígado e intestino, realizando o transporte do colesterol, proveniente da degradação celular, ao fígado e outros tecidos (GOTTO *et al.*, 2006).

As lipoproteínas diferem entre si quanto ao teor lipídico, de acordo com sua função; quanto à apoproteínas, que lhes confere especificidade junto a seus receptores teciduais e quanto ao tamanho e densidade.

Os triacilgliceróis da dieta sofrem lise sob ação da lipase no lúmen intestinal. Os ácidos graxos livres resultantes são absorvidos e metabolizados em triacilgliceróis no eritrócito, compondo os quilomícrons junto com o colesterol absorvido por meio dos ácidos biliares. Os quilomícrons circulam por vasos linfáticos e caem na circulação sanguínea pelo ducto torácico, onde sofrem ação da lipase lipoprotéica dos capilares musculares e adiposos. A lipase lipoprotéica é ativada na presença de insulina e

promove a degradação dos quilomícrons, liberando ácidos graxos para o consumo tecidual. Os remanescentes dos quilomícrons resultantes são captados e metabolizados pelo fígado por completo (MAHLEY, 2003).

Os triacilgliceróis sintetizados pelo fígado são transportados para os tecidos periféricos pelas VLDL, que também são hidrolisadas pela lipase lipoprotéica em processo semelhante ao que ocorre aos quilomícrons. As partículas resultantes IDL e LDL, podem ser captadas e metabolizadas pelo fígado ou, no caso das LDL, hidrolisadas por tecidos periféricos para utilização do colesterol (MAHLEY, 2003).

As HDL produzidas pelo fígado e intestino são responsáveis pela remoção do colesterol resultante do catabolismo celular e por seu transporte para o fígado. Esse processo ocorre diretamente, ou de forma indireta, pela transferência do colesterol esterificado para VLDL ou IDL. A enzima responsável pela esterificação do colesterol em HDL é a LCAT (lecitina colesterol aciltransferase). A CETP (proteína transferidora de ésteres de colesterol) é a enzima responsável pela transferência de ésteres de colesterol da HDL para VLDL e IDL (SMITH *et al.*, 1990).

QUADRO 3: Classificação das Dislipidemias

Distúrbio	Manifestações
Hipercolesterolemia isolada	Elevação do colesterol total (aumento LDL)
Hipertrigliceridemia isolada	Elevação isolada dos triacilgliceróis
Hiperlipidemia mista	Valores aumentados de triacilgliceróis e colesterol total
HDL colesterol baixo	Isolado ou com aumento de LDL e triacilgliceróis

FONTE: SANTOS, 2001.

As Dislipidemias podem ser classificadas por meio de resultados laboratoriais ou por sua etiologia (QUADRO 3). Os distúrbios das lipoproteínas são detectados através da determinação dos lipídeos no soro depois de jejum de dez horas. O risco de cardiopatia aterosclerótica aumenta com as concentrações das lipoproteínas aterogênicas, esta inversamente relacionado aos níveis de HDL e é modificado por outros fatores de risco (QUADRO 4). As evidências de estudos clínicos sugerem que

os níveis de colesterol das LDL de 60 – 70 mg/dL podem ser ótimos para pacientes diabéticos e com coronariopatias. Em condições ideais, os níveis de triglicerídeos devem ser inferiores a 150 mg/dL.

QUADRO 4: Valores de referência para lipídeos de adultos

	Desejável	Limítrofe a elevado ¹	Elevado
Colesterol total	< 200 (5,2) ²	200 – 239 (5,2 – 6,2) ²	> 240 (6,2) ²
Colesterol LDL	< 130 (3,4) ³	130 – 159 (3,4 – 4,1)	> 160 (4,1)
Colesterol HDL			> 60 (1,55)
Homens	> 40 (1,04)		
Mulheres	> 50 (1,30)		
Triglicerídeos	< 150 (1,7)	150 – 199 (1,7 – 2,3)	> 200 (2,3)

¹Considerar elevado na presença de diabetes, coronariopatia ou mais dois fatores de risco.

²mg/dL (mmol/L).

³Nível ótimo é < 100 (2,6).

2.4.1.1 Dislipidemias Primárias (Genéticas)

A maioria dos pacientes com Dislipidemia primária apresenta a doença poligênica. Deve-se a causas genéticas, e algumas só se manifestam devido à dieta inadequada e/ou sedentarismo. A influência dos genes nos níveis plasmáticos de lipídeos situa-se em torno de 60%. A grande variabilidade dos valores plasmáticos deve-se a interação dos poligenes e múltiplos fatores ambientais, acarretando, assim, uma ampla gama de fenótipos em nível populacional. Apenas uma pequena proporção dos casos apresenta mecanismo genético bem definido, manifestando-se como fenótipos de distribuição familiar típica de herança monogênica (HUMPHRIES, 1995).

As Dislipidemias primárias englobam as hiperlipidemias e as hipolipidemias:

- Hipercolesterolemia familiar: doença monogenética autossômica dominante em que ocorre a mutação de um dos alelos do gene do receptor LDL.
- Hipercolesterolemia poligênica: ocorre sobre a determinação de múltiplos genes de padrão não definido, cuja expressão é altamente influenciada por fatores ambientais.

- Hiperlipidemia familiar combinada: doença poligênica que não apresenta alteração genética conhecida. Ocorre aumento da produção das VLDL pelo fígado e redução da remoção das VLDL e quilomícrons circulantes, resultando em aumento de triacilgliceróis, colesterol total e LDL plasmáticos.
- Hipertrigliceridemia familiar: doença autossômica dominante, cuja base genética é desconhecida. Ocorre produção aumentada de triglicerídeos pelo fígado e, conseqüentemente, de VLDL, observando-se geralmente níveis de triglicerídeos plasmáticos acima de 500 mg/dL.
- Hiperquilomicronemia familiar: doença autossômica recessiva rara, na qual ocorre uma intensa diminuição da remoção de quilomícrons da circulação, devido à ausência de atividade da lipase lipoprotéica (LLP) tecidual, ou por falta de apoproteína CII na molécula do quilomícron, um ativador obrigatório da LLP.
- Disbetalipoproteinemia familiar: é caracterizada por variação polimórfica da apoproteína E, resultando no acúmulo de quilomícrons remanescentes e de VLDL, também denominados de IDL. A apolipoproteína E é uma das proteínas responsáveis pelo reconhecimento da partícula de VLDL pelo seu receptor tecidual.
- Doença de Tangier e hipoalfalipoproteinemia: caracterizam-se por mutações no gene que codifica a proteína responsável pelo efluxo de colesterol pela partícula de HDL, fator fundamental no transporte reverso de colesterol promovido pela HDL.

2.4.1.2 Dislipidemias Secundárias

Diversas situações clínicas e alguns medicamentos podem alterar o metabolismo de uma ou mais lipoproteínas, ocasionando dislipidemias, ou influenciar a manifestação e piora das dislipidemias primárias. As principais causas de dislipidemias secundárias são DM, síndrome metabólica, obesidade, hipotireoidismo, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, hepatopatias colestáticas crônicas, hipercortisolismo, anorexia nervosa, infecção pelo vírus HIV e etilismo (SANTOS, 2001).

Alguns fármacos podem igualmente alterar o metabolismo das lipoproteínas, resultando em níveis de colesterol e triacilgliceróis alterados. Diuréticos e beta-bloqueadores podem resultar em hipertrigliceridemia e redução dos níveis de HDL. Anticoncepcionais orais e corticosteróides ocasionam elevação de triacilgliceróis e colesterol. Os anabolizantes podem aumentar os níveis de colesterol e reduzir os de HDL. Isotretinoína e ciclosporina aumentam os níveis de colesterol, triacilgliceróis e HDL. Os

antiretrovirais podem ser responsáveis pelas hipertrigliceridemias mais graves, associadas ou não a hipercolesterolemia.

2.4.1.3 Aterosclerose

A associação entre dislipidemias e aterosclerose é universalmente aceita pela comunidade científica. Os dados que permitem estabelecer com segurança esse vínculo foram obtidos em estudos anatomo-patológicos, experimentais, epidemiológicos e clínicos, a maioria deles, utilizando para análise, valores bioquímicos das dosagens de colesterol total, triacilgliceróis e HDL ou a determinação de LDL (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 1996).

A aterosclerose é uma doença baseada na resposta inflamatória crônica, resultante da interação de lipoproteínas aterogênicas, tais como, LDL, VLDL e Lp(a), com componentes celulares (monócitos, macrófagos, linfócitos T, células endoteliais e células musculares lisas) e matriz extra celular. É doença multifatorial com características crônico-degenerativas, tendo a concentração de colesterol nas lipoproteínas importante contribuição na evolução do processo aterosclerótico. A disfunção endotelial induzida, principalmente, pela exposição do endotélio vascular à LDL oxidada é a primeira etapa na aterogênese.

A partir do dano vascular, diferentes mediadores inflamatórios são liberados no espaço subendotelial, onde os monócitos são diferenciados em macrófagos através de processos de maturação celular. Com a manutenção e/ou ampliação desse processo, ocorre, finalmente, à formação da placa aterosclerótica. Esta é constituída por elementos celulares (endotélio, musculatura lisa, fibroblastos e macrófagos), componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico organizados, sob a forma estável ou instável. As placas estáveis caracterizam-se por predomínio de colágeno, compondo uma capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico menos proeminente. As placas instáveis apresentam atividade proteolítica intensa, alta concentração de células inflamatórias, núcleo lipídico relevante e capa fibrosa tênue. A instabilidade dessas placas parece relacionar-se com as suas características morfológicas e bioquímicas. A placa estável esta mais associada à oclusão arterial, enquanto a placa instável pode levar a síndrome coronariana aguda, relacionada ou não a eventos clínicos fatais (ROSS, 1999).

Neste sentido, novos marcadores de risco, relacionado ao metabolismo lipídico, aos fatores de coagulação e à inflamação, têm sido utilizados na detecção e monitoramento da evolução da aterosclerose. Esses marcadores evidenciam os pacientes que, aparentemente sem risco, desenvolvem eventos coronarianos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 1996).

As manifestações clínicas da aterosclerose, em geral, surgem a partir da meia idade, porém, vários estudos demonstraram que o processo aterosclerótico pode ter início na infância e o ritmo de progressão está relacionado com a presença de fatores de risco clássicos identificado no adulto, como obesidade, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, DM, história familiar, idade e nível de atividade física (MCGILL *et al.*, 2000).

2.4.2 Tratamento Dietético da Hiperlipoproteinemia

As medidas dietéticas são sempre as primeiras a ser instituídas, podendo eliminar a necessidade de fármacos. As exceções incluem pacientes com hipercolesterolemia familiar ou com hiperlipidemia combinada familiar, nos quais é aconselhável instituir simultaneamente a dieta e a terapia farmacológica. O colesterol, as gorduras saturadas e as gorduras *trans* constituem os principais fatores que influenciam os níveis de LDL, enquanto a restrição de gorduras e calorias totais é importante no controle dos triglicerídeos.

Os níveis de lipoproteínas também são afetados, porém em menor grau, por outros fatores dietéticos. Ocorrem elevações das VLDL quando se aumenta a ingestão de carboidratos. Nos pacientes com hipertrigliceridemia, a sacarose e outros açúcares simples tendem a elevar os níveis das VLDL. A ingestão excessiva de calorias aumenta a síntese secreção de VLDL.

As calorias na forma de gorduras totais devem corresponder a 20-25% da dieta, com menos de 8% constituídos por gorduras saturadas, enquanto o colesterol deve ser inferior a 200 mg/dia. Com esse esquema, são obtidas reduções nos níveis séricos de colesterol na faixa de 10 a 20%.

A suplementação com as vitaminas antioxidantes, ácido ascórbico e tocoferóis naturais pode ser benéfica. Outros antioxidantes de ocorrência natural, como o

resveratrol, β -catequina, o selênio e vários carotenóides encontrados numa variedade de frutas e vegetais, podem proporcionar uma defesa antioxidante adicional. Os flavonóides inibem a oxidação da LDL e a redução da agregação plaquetária. A oxidação de LDL desempenha papel relevante na patogênese da aterosclerose (SANTOS, 2001).

2.4.3 Fármacos Utilizados no Tratamento da Hiperlipidemia

O uso da terapia farmacológica baseia-se no defeito metabólico específico e no seu potencial de causar aterosclerose ou pancreatite. A dieta deve ser mantida para que o esquema farmacológico atinja o seu pleno potencial. Todos os fármacos devem ser evitados em mulheres grávidas e durante a fase de lactação. As crianças com hipercolesterolemia familiar podem ser tratadas com uma resina ou com inibidor da redutase, geralmente depois de 7 ou 8 anos de idade, quando a mielinização do sistema nervoso está praticamente concluída. Os fármacos raramente estão indicados antes dos 18 anos de idade.

Os inibidores competitivos da HMG-CoA redutase (estatinas) são análogos estruturais da HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A). A lovastatina, a atorvastatina, a fluvastatina, a pravastatina, a sinvastatina e a rosuvastatina pertencem a essa classe. Esses fármacos são mais eficazes na redução dos níveis de LDL. Outros efeitos observados incluem diminuição do estresse oxidativo e da inflamação vascular com aumento da estabilidade das lesões ateroscleróticas. A lovastatina e a sinvastatina são pró-drogas lactônicas inativas, que são hidrolisadas no trato gastrintestinal aos derivados dos beta-hidroxilas ativos, enquanto a pravastatina possui um anel lactônico abeto e ativo. A atorvastatina, a fluvastatina e a rosuvastatina são congêneres que contêm flúor e são ativos quando administrados. A absorção das doses ingeridas dos inibidores da redutase varia de 40 a 75%, a exceção da fluvastatina, cuja absorção é quase completa. Todos os inibidores da redutase sofrem elevada extração de primeira passagem pelo fígado. A maior parte da dose absorvida é excretada na bile, e cerca de 5 – 20% são excretados na urina. A meia vida plasmática desses fármacos varia de 1 a 3 horas, a exceção da atorvastatina, cuja meia vida é de 14 horas, e da rosuvastatina, que é de 19 horas.

A HMG-CoA redutase medeia a primeira etapa comprometida na biossíntese de esteróis. As formas ativas dos inibidores da redutase consistem em análogos estruturais

do intermediário HMG-CoA, que é formado pela redutase na síntese do mevalonato. Esses análogos causam inibição parcial da enzima e, portanto, podem comprometer a síntese de isoprenóides como a ubiquinona e o dolicol. Esse efeito aumenta tanto o catabolismo fracional das LDL quanto a extração hepática dos precursores das LDL (remanescentes das VLDL), reduzindo, assim, os níveis plasmáticos de LDL.

Os inibidores da redutase mostram-se úteis, isoladamente ou com resinas, niacina ou ezetimiba, na redução de LDL. Como a biossíntese de colesterol ocorre predominantemente à noite, esses fármacos – à exceção da atorvastatina e da rosuvastatina – devem ser administrados à noite, se for utilizada uma dose única ao dia. As doses diárias da lovastatina variam de 10 a 80 mg. A pravastatina é quase tão potente quanto a lovastatina. A sinvastatina é duas vezes mais potente e é administrada em doses de 5 – 80 mg ao dia. A fluvastatina parece ter metade da potência da lovastatina. A atorvastatina é administrada em dose de 10 – 80 mg/dia, e a rosuvastatina, que é o agente mais eficaz no tratamento da hipercolesterolemia grave, em doses de 10 – 40 mg/dia. As estatinas geralmente são bem toleradas, mas podem provocar sintomas como cefaléia, distúrbios gastrintestinais, dores musculares, prurido, alterações das enzimas hepáticas e, mais raramente, rabdomiólise. Devido a esse último efeito, a cerivastatina não é mais comercializada.

A niacina (ácido nicotínico) diminui os níveis de VLDL e LDL. Com frequência, aumenta significativamente os níveis de HDL. Esse fármaco é convertido no organismo em amida, que é incorporada ao dinucleotídio de niacinamida adenil (NAD), é excretada na urina em sua forma inalterada, bem como na forma de vários metabólitos. O ácido nicotínico inibe a secreção de VLDL e conseqüentemente diminui a produção de LDL. A depuração aumentada das VLDL através da via de LDL contribui para redução dos triacilgliceróis e o catabolismo do HDL diminui.

A niacina mostra-se útil em pacientes com hiperlipoproteinemia combinada, bem como naqueles que apresentam disbetalipoproteinemia familiar. No tratamento da hipercolesterolemia familiar, a maioria dos pacientes necessita de 2 – 6 g de niacina ao dia, e não se deve ultrapassar essa dose. Para outros tipos de hipercolesterolemia e para a hipertrigliceridemia, é frequentemente administrado 1,5 – 3,5 g ao dia. A maioria dos indivíduos apresenta vasodilatação inócua e sensação de calor após cada dose, quando se inicia o fármaco ou quando se aumenta a dose. Foi relatada a ocorrência de prurido,

erupções cutâneas, ressecamento da pele ou mucosas e acantose nigricans. Podem ocorrer elevações reversíveis de até duas vezes os níveis anormais de aminotransferases. A tolerância aos carboidratos pode estar moderadamente alterada, porém esse distúrbio também é reversível. Todavia, em alguns pacientes com diabetes, esse efeito pode não ser totalmente reversível.

A genfibrozila, o bezafibrato e o fenofibrato (derivados do ácido fíbrico) diminuem os níveis de VLDL e, em alguns pacientes das LDL. O fenofibrato é um metil etil éster, que é totalmente hidrolisado no intestino, com meia-vida plasmática de 20 horas. Ocorre a excreção de 60% na urina sob a forma de glicuronídeo, enquanto cerca de 35% são eliminados nas fezes. A genfibrozila é absorvida quantitativamente pelo intestino e liga-se fortemente as proteínas plasmáticas. Sofre circulação entero-hepática e atravessa fortemente a placenta. Sua meia-vida plasmática é de 1 – 5 horas. Ocorre eliminação de 70% através dos rins, a maior parte sob forma inalterada. O fígado modifica parte dos fármacos nos derivados hidroximetil, carboxil ou quinol. Esses fármacos atuam primariamente como ligantes do receptor de transcrição nuclear, o receptor alfa ativado pelo proliferador peroxissômico. Aumentam a lipólise dos triglicerídios das lipoproteínas através da LPL. A lipólise intracelular no tecido adiposo encontra-se diminuída. Os níveis de VLDL diminuem, devido, em parte, à secreção diminuída pelo fígado. O colesterol das HDL aumentam moderadamente. Parte desse aumento aparente representa uma consequência da redução dos níveis plasmáticos de triglicerídios, com diminuição da troca de triglicerídios em HDL, no lugar de ésteres de colesterol.

Os derivados do ácido fíbrico mostram-se úteis nas hipertrigliceridemias em que predominam as VLDL, bem como na disbetalipoproteinemia. Podem ser benéficos no tratamento da hipertrigliceridemia que surge em decorrência do tratamento com inibidores das proteases virais. A dose habitual da genfibrozila é de 600 mg por via oral, uma ou duas vezes ao dia. A dose do fenofibrato é de uma a três comprimidos de 54 mg ou 160 mg ao dia. Os efeitos adversos consistem em erupções cutâneas, sintomas gastrintestinais, miopatias, arritmias, hipocalcemia e níveis sanguíneos elevados de aminotransferases ou de fosfatase alcalina. Alguns pacientes apresentam reduções da contagem de leucócitos ou do hematócrito.

O colestipol, a colestiramina e o colesevelam (resinas de ligação de ácidos biliares) são apenas úteis nos casos de elevações isoladas das LDL. Em pacientes que também

apresentam hipertrigliceridemia, os níveis de VLDL podem aumentar ainda mais durante o tratamento com resinas. Esses fármacos consistem de grandes resinas poliméricas trocadoras de cátions, que são insolúveis em água. Ligam-se aos ácidos biliares na luz intestinal, impedindo a sua reabsorção. A resina em si não absorvida. Os ácidos biliares, metabólitos do colesterol, são normalmente reabsorvidos com eficiência no jejuno e no íleo. Sua excreção aumenta até dez vezes quando se administram resinas, resultando em uma conversão aumentada do colesterol em ácidos biliares no fígado através de 7 α -hidroxilação, que é normalmente controlada pelos ácidos biliares através de retroalimentação negativa.

As resinas são utilizadas no tratamento de pacientes com hipercolesterolemia primária, produzindo uma redução de cerca de 20% no colesterol das LDL quando administrada em dose máxima. Esses fármacos são utilizados em associação com outros fármacos para obter maior efeito hipocolesterolêmico. O colestipol e a colestiramina são disponíveis na forma de preparações granuladas. A dose máxima é de 16 g ao dia. O colesevelam é disponível em comprimidos de 625 mg. A dose máxima é de seis comprimidos ao dia. As queixas comuns relacionadas ao uso desses fármacos são constipação e distensão abdominal, que habitualmente são aliviadas ao aumentar-se o conteúdo de fibras da dieta. Em alguns pacientes, foi relatada a ocorrência de pirose, diarreia e má absorção de vitamina K, resultando em hipoprotrombinemia.

A ezetimiba é o primeiro membro de um novo grupo de fármacos que inibem a absorção intestinal de esteróis e colesterol, mostra-se eficaz até mesmo na ausência de colesterol dietético, visto que inibe a reabsorção do colesterol excretado na bile. Seu efeito clínico primário consiste na redução dos níveis de LDL. É um fármaco rapidamente absorvido e conjugado no intestino a um glicuronídeo ativo, atingindo níveis sanguíneos máximos em 12 – 14hs. Sofre circulação entero-hepática e a sua meia-vida é de 22 horas. Cerca de 80% são excretados nas fezes. O efeito sobre a absorção do colesterol é constante numa faixa posológica de 5 – 20 mg/dia. Em pacientes com hipercolesterolemia primária, a redução média do colesterol das LDL com a administração de ezetimiba isoladamente é de cerca de 20%, com aumento de HDL.

Referências

1. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. **Diabetes Care**, 29: 543-548, 2006.
2. AMERICAN HEART ASSOCIATION. *Heart disease and stroke statistics – 2004 Update*. **AMERICAN HEART ASSOCIATION**, 2003.
3. CROTEAU, R.; KUTCAHN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural Products (secondary metabolism). In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSSEN, W.; JONES, R.L. *Biochemistry and molecular biological of plants*. **American society of plant phisologist**, 1250-1319, 2000.
4. DEWHALLEY, C.V.; RANKIN, S.M.; HOULT, R.S. JESSUP, W.; LEAKE, D.S. *Flavonoid inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages*. **Biochem Pharmacol**. 39:1743-1750, 1990.
5. DYNTAR, D.; SERGEEV, P.; KLISIC, J.; AMBUHL, P.; SCHAUB, M.C.; DONATH, M.Y. *High glucose alters cardiomyocyte contacts and inhibits myofibrillar formation*. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 91(5): 1961-1967, 2006.
6. ERLUND, I. *Review of the flavonoids quercetin, hesperitin and narigenin. Dietary sources bioactivies, bioavailability, and epidemiology*. **Nutrition Research**. 24: 851-674.
7. HAVSTEEN, B.H. *The biochemistry and medical significance oh the flavonoids*. **Pharmacol. Terap**. 96: 67-202, 2002.
8. ESPIN, J. C.; GARCIA-CONESA, M.T.; TOMAZ-BARBERAN, F.A. *Nutraceuticals: facts and fictions*. **Phytochemistry**, 68: 2986-3008, 2007.
9. ESTERBAUER, H.; GEBICKI, J.; PUHL, H.; JURGENS, G. *The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL*. **Free Radical Biol. Med**. 13:341-390, 1992.
10. EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. *Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus*. **Diabetes Care**, 25(1): 02-05, 2002.
11. FANG, T.; WANG, Y.; MA, Y.; SU, W.; BAI, Y.; ZHAO, P. *A rapid LC/ MS/ MS quantitation assay for naringin and its two metabolites in rats plasma*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 40: 454-459, 2006.
12. GOTTO, A.M.; POWNALL, H.J. *Introduction to the plasma lipoproteins*. **Methods Enzymol**, 128: 03-41, 2006.
13. HANLEY, A.J.G.; WILLIAMS, K.; FESTA, A.; WAGENKNECHT, L.E.; D'AGOSTINO Jr, R.B.; KEMPF, J.; ZINMAN, B.; HAFFNER, S.M. *Elevations in markers of liver injury and risk of type 2 diabetes*. **Diabetes**, 53: 2623-2632, 2004.
14. HARRISON, T.R. **Medicina Interna**, Rio de Janeiro: editora Mc Graw Hill Interamericana do Brasil, 15ª. ed.: v. 2, 2240 p., 2002.

15. HAVSTEEN, B.H. *The biochemistry and medical significance of the flavonoids*. **Pharmacol. Therap.** 96: 67-202, 2002.
16. HERRMAN, C.E.; SANDERS, R.A.; KLAUNIG, J.E.; SCHWARZ, L.R.; WATKINS, J.B. *Decreased apoptosis as a mechanism for hepatomegaly in streptozotocin-induced diabetic rats*. **Toxicological Sciences**, 50: 146-151, 1999.
17. HSIU, S.L.; HUANG, T.Y.; HOU, Y.C.; CHIN, D.H.; CHAO, P.D.L. *Comparison of metabolic pharmacokinetics of naringin and naringenin in rabbits*. **Life Sciences**. 70: 1481-1489, 2002.
18. HUMPHRIES, S.E.R. *The genetic determinates of plasma cholesterol and response to diet*. **Baillieres Clin. Endocrinol Metab**, 02: 200-208.
19. Informação adaptada do Datasus 2003 (on line). Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>> Acesso em: 2008.
20. ISHII, K.; FURUTA, T.; KASUYA, Y. *Determination of naringin and naringenin in human urine by high-performance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction*. **Journal of Chromatography B**. 704: 299-305, 1997.
21. JUNG, U.J.; LEE, M.K.; PARK, Y.B.; KANG, M.A.; CHOI, M.S. *Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 35: 1134-1145, 2006.
22. JUZWIAK, S.; WOJCICKI, J.; MOKRZYCKI, K.; MARCHLEWICZ, M.; BIALECKA, M.; WENDA-ROZEWICKA, L. GAWRONSKA-SZKLARZ B, DROZDZIK M. *Effect of flavonoids on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits*. **Pharmacol Rep**. 57(5):604-609, 2005.
23. KATZUNG, B.G. *Farmacologia Básica & Clínica*. Editora Guanabara Koogan. 9ª ed. Rio de Janeiro, 2006.
24. LESSA, I. *Níveis séricos de creatinina: hipercreatinemia em segmento da população adulta de Salvador, Brasil*. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 07(2): 176-186, 2004.
25. LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S. *Flavonóides*. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, 03: 18-22, 2000.
26. MAHLEY, R.W. *Disorders of lipid metabolism*. **Williams Text-book of Endocrinology**, 10th ed. Philadelphia: WB Saunders. p. 1642-1705, 2003.
27. MANN, J. *Secondary metabolism*. Oxford Science, 374-378, 2001.
28. MCGILL, H.C.; MCMAHAN, C.A.; HERDERICK, E.E.; MALCON, G.T.; TRACY, R.E.; STONG, J.P. *Original of atherosclerosis in childhood and adolescence*. **American Journal Clin. Nutr.** 72: 1307-1305, 2000.

29. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Informações hospitalares do datasus*. Disponível em: <[http:// www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br)> Acesso em: 2005.
30. NAGEM, T.J.; PEREIRA, L.W.; OLIVEIRA, T.T.; PINTO, A.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; STRINGHETA, P.C. *Efeitos da naringina e dos corantes naturais antocianina e carmin no metabolismo lipídico*. **Revista Brasileira de Farmacologia**. 80: 25-28, 1999.
31. OLIVEIRA, T.T.; LIBERATO, S.C.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; MAGALHÃES, N.M.; LIMA, E.Q.; BRUNORO, M.N.C.; BRESSAN, J.; COSTA, M.R.; SILVA, R.R.; LEÃO, M.A. *Efeito da naringenina e fruta-de-lobo no diabetes*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 34(3): 161-165, 2002a.
32. OLIVEIRA, T.T.; GOMES, S.M.; NAGEM, T.J.; COSTA, N.M.B.; SECOM, P.R. *Efeito de diferentes doses de flavonóides em ratos hiperlipidêmicos*. **Rev. Nutr.** 15(1): 45-51, 2002b.
33. RIBEIRO, M.H.L.; ISABEL, A.C. *Kinect modeling of naringin hydrolysis using a bitter sweet al.fa-rhaminopyranosidase immobilized in k-carrageenan*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 51: 10-18, 2008a.
34. RIBEIRO, M.H.L.; ISABEL, A.C. *Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method*. **Food Control**. 19: 432-438, 2008b.
35. RIBEIRO, I.A.; ROCHA, J.; SEPODES, B.; MOTA-FILIPÉ.; RIBEIRO, M.H.L. *Effect oh naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds*. **Journal of Molecular Catalysis B; Enzymatic**. 52-53: 13-18, 2008.
36. RICE-EVANS, C. *Flavonoids and isoflavones: absorptions, metabolism and bioactivity*. **Free Radic. Biol. Med.** 36: 827-828, 2004.
37. ROSS, R. *Atherosclerosis: an inflammatory disease*. **New England J. Med.** 340: 115-126, 1999.
38. SANTOS, R.D. *III Diretrizes brasileira sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da sociedade brasileira de cardiologia*. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**, 77: 01-48, 2001.
39. SIQUEIRA, A.F.A.; PITITTO, B.A. *Doença cardiovascular no diabetes mellitus: análise dos fatores de risco clássicos e não-clássicos*. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, 51: 257-267, 2007.
40. SMITH, L.H.; THEIR, S.O. *Fisiopatologia: Os Princípios Fisiológicos das Doenças*, 2th ed. Panamericana: p. 360-383, 1990.
41. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. *Consenso brasileiro de dislipidemias 1996: detecção, avaliação e tratamento*. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, 67: 01-16, 1996.
42. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. *IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da*

sociedade brasileira de cardiologia. Arquivos Brasileiro de Cardiologia, 88(1): 02-19, 2007.

43. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *Consenso brasileiro sobre diabetes 2002: diagnóstico e classificação do diabetes mellitus e tratamento do diabetes mellitus do tipo 2*. Rio de Janeiro, maio. 2002. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/educacao/docs/Consenso_atual_2002.pdf>. Acesso em: 8 Jun. 2007.
44. SUDHEESH, S.; PRESANNAKUMAR, G.; VIJAYAKUMAR, S.; VIJAYALAKSHMI, N.R. *Hypolipidemic effect of flavonoids from Solanum melogena. Plant Foods for Human Nutrition*, 51:321-330, 1997.
45. WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projection for 2030. Diabetes Care*, 27(5): 1047-1053, 2004.
46. ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMOES, C.A.; SHENKEL, E.P.; GOSMAM, G.; MELLO, J.C.P.; MANTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacologia: da planta ao medicamento**, Porto Alegre: editora da UFSC45, 23: 489-516, 1999.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar avaliação biofarmacotécnica de cápsulas e comprimidos de naringina para tratamento de Diabetes e Dislipidemias.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Avaliar a estabilidade do fármaco naringina em fluído gástrico simulado e fluído intestinal simulado;

B) Avaliar a compatibilidade entre a naringina e excipientes farmacotécnicos através de calorimetria diferencial de varredura;

C) Desenvolver um medicamento em formas farmacêuticas sólidas a partir do flavonóide naringina;

D) Realizar a avaliação física e físico-química das cápsulas e comprimidos desenvolvidos no item C;

E) Avaliar o tempo de desintegração e o perfil de dissolução das cápsulas e comprimidos desenvolvidos no item C;

F) Avaliar a atividade antioxidante e antifúngica dos flavonóides naringina e naringenina;

G) Determinar o efeito das cápsulas e dos comprimidos de naringina e de um hipoglicemiante de uso oral nos modelos experimentais diabéticos;

H) Determinar o efeito das cápsulas e dos comprimidos de naringina e de uma estatina nos modelos experimentais hipercolesterolêmicos;

I) Acompanhar o efeito dos tratamentos com naringina nos níveis de glicose, hemoglobina glicosilada, perfil lipídico, TGO, TGP, proteínas totais, albumina, uréia, creatinina e ácido úrico.

4 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GASTRINTESTINAL

4.1 INTRODUÇÃO

Os fármacos raras vezes são administrados isoladamente. Eles fazem parte de uma formulação combinada com um ou mais agentes não medicinais com funções de solubilizar, suspender, espessar, diluir, emulsificar, estabilizar, conservar, colorir, flavorizar e possibilitar a obtenção de formas farmacêuticas estáveis, eficazes e atraentes. Com o uso seletivo desses agentes não medicinais, denominados excipientes farmacêuticos, resultam formas farmacêuticas de vários tipos (FRANCELINO *et al.*, 2008).

Os medicamentos são utilizados com finalidade profilática, terapêutica ou diagnóstica. Contêm uma (ou mais) substâncias ativas que devem ser administradas ao paciente através de uma das vias possíveis, veiculada (s) em forma farmacêutica sólida, semi-sólida ou líquida. As formas farmacêuticas sólidas de uso oral (FFSO) são as mais usadas. Após a administração de uma FFSO, o fármaco deve ser liberado e dissolver nos fluidos gastrintestinais para que seja absorvido e exerça a ação farmacológica esperada (ANSEL *et al.*, 2005).

As FFSO com liberação convencional são desenvolvidas para liberar o fármaco rapidamente após a administração, sendo empregado nesses sistemas diluentes solúveis, desintegrantes e/ou outros recursos que favoreçam o processo de liberação e dissolução do fármaco (PEZZINI *et al.*, 2007).

A via oral é, sem dúvida, a mais utilizada na administração de medicamentos. Embora seja a mais aceita pelos pacientes, nem sempre é a mais adequada à administração de fármacos, já que substâncias pouco solúveis ou incluídas em formas farmacêuticas mal elaboradas podem não ser completamente absorvidas. Em circunstâncias normais, pode-se esperar que o fármaco permaneça no estômago por 2 a 4 horas (tempo de esvaziamento gástrico) e no intestino delgado durante 4 a 10 horas. Dessa forma, no desenvolvimento de uma formulação, deve-se dar atenção a fatores capazes de retardar ou acelerar o processo de disponibilização do fármaco no trato gastrintestinal, dentre os quais os relacionados com as propriedades físico-químicas e outras características do fármaco (LONGER & ROBINSON, 1995).

A administração oral envolve grande complexidade na interpretação de três elementos chaves: o fármaco, a forma farmacêutica e o sistema gastrintestinal. Alguns fármacos são rapidamente absorvidos no estômago ou intestino delgado, outros possuem baixa permeabilidade, e ainda têm os que não são estáveis ao pH gástrico ou intestinal. Muitos fármacos apresentam efeito subterapêutico ou perfil indesejado de efeitos colaterais quando formulados para administração oral. Assim, estes fármacos devem ser formulados em formas farmacêuticas que permitem manter uma concentração sistêmica, dentro da janela terapêutica, por um longo período de tempo, permitindo reduzir o número de administrações e garantindo o efeito farmacológico e a estabilidade da formulação.

A estabilidade gastrintestinal de fármacos administrados por via oral é um parâmetro de grande importância para o desenvolvimento de medicamentos de qualidade confiável e eficácia reconhecida. No trato gastrintestinal os fármacos estão expostos a acidez do estômago e a pancreatina presente no intestino. As exposições de fármacos a essas condições podem conduzir a uma decomposição/degradação ácida ou enzimática (ASAFU-ADJAYE *et al.*, 2007).

Além da estabilidade gastrintestinal, a avaliação de compatibilidades entre o fármaco e os componentes da formulação é um dos principais fatores que devem ser considerados no desenvolvimento farmacotécnico. Esses estudos são realizados rotineiramente pela indústria farmacêutica.

As técnicas termoanalíticas apresentam inúmeras vantagens nos estudos de interação entre princípios ativos e excipientes, estudo de cinética de degradação e estabilidade de formas farmacêuticas, entre outras aplicações. Podem ser utilizadas tanto no controle de matéria-prima, quanto do produto acabado, possuindo potencial de emprego no desenvolvimento e caracterização de novos produtos, avaliação dos processos produtivos e outras aplicações (BAZZO & SILVA, 2005).

A análise térmica é definida como grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura e/ou tempo, enquanto essa substância é submetida a um programa controlado de temperatura e sob uma atmosfera específica.

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica de análise térmica, na qual se mede a diferença de energia fornecida à uma substância e a um material de referencia (termicamente estável), em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referencia são submetidos a uma programação controlada de temperatura. A amostra e o material de referência são colocados em cápsulas idênticas, localizadas sobre o disco termoelétrico e aquecidas por uma única fonte de calor. As curvas DSC obtidas nesse sistema mostram picos ascendentes que caracterizam eventos exotérmicos, enquanto os descendentes eventos endotérmicos. Durante o processo de aquecimento ou resfriamento, a amostra pode sofrer alterações de temperatura devido a eventos endotérmicos e exotérmicos. Nesse caso, registra-se o fluxo de calor diferencial necessário para manter a amostra e o material de referência à mesma temperatura. Essa diferença de temperatura entre a amostra e o padrão é devida a fenômenos químicos (decomposição/combustão) ou físicos (mudanças de estado ou transições cristalinas) (SILVA *et al.*, 2007).

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Perfil de Dissolução

Foram avaliados os padrões de naringina e naringenina adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). O perfil de dissolução para os fármacos foi realizado segundo recomendações da USP 27 (2005) e utilizando 25 mg de cada fármaco. As especificações para o teste estão resumidas no QUADRO 5.

QUADRO 5: Especificações do ensaio para avaliação do perfil de dissolução da naringina e naringenina

Temperatura	37 ± 0,5° C
Aparato de agitação	1 (cesta 40 mesh)
Velocidade de agitação	100 rpm
Volume de meio	900mL

Como meio de dissolução foi utilizado água destilada e desgazeificada. A água destilada foi filtrada em filtro de 0,5 µm e em seguida colocada em banho de ultrassom por 15 minutos para remoção de gás (desgazeificação).

Os perfis de dissolução foram construídos a partir da quantificação da naringina e naringenina dissolvida nas cubas de dissolução, em intervalos de tempo pré-definidos. Padronizou-se coletas de alíquotas dos meios (10 mL) nos tempos: 1, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos, e, a cada tomada de ensaio, o meio de dissolução foi repostado. As alíquotas amostradas foram filtradas em filtros de 0,5 µm.

As concentrações dos flavonóides dissolvidos foram obtidas por espectrofotometria no ultravioleta (UV) em comprimento de onda de 284 nm para naringina e de 289 nm para naringenina. As amostras foram retiradas da cuba e diluídas em metanol para quantificação. Foi preparada curva de calibração com padrões de naringina e naringenina nas concentrações 0.027, 2.7, 13.5, 27, 32, 54, 128, 256, 512 e 1024 µg/mL, utilizando metanol e água (50:50) como diluente. Os valores de absorvância obtidos foram comparados com a curva de calibração e utilizou-se a equação da reta para determinação das concentrações de naringina e naringenina dissolvidas.

4.2.2 Avaliação da Estabilidade Gastrintestinal da Naringina

Preparou-se curva de calibração com padrões de naringina e naringenina nas concentrações 10, 20, 60, 80 e 120 µg/mL.

A avaliação da estabilidade da naringina foi realizada diluindo 40 mg do padrão do fármaco em 10 mL de fluido gástrico simulado (FGS) ou fluido intestinal simulado (FIS) preparado de acordo com a USP-27 (QUADRO 6), na temperatura de 37°C ± 1° C, sendo coletadas alíquotas de 1 mL nos intervalos de tempo 0, 30, 60, 90 e 120 minutos (BHATTARAI *et al.*, 2007). Para o FIS foi coletada, ainda, uma alíquota no tempo 240 minutos. A cada 1 mL coletado acrescentou-se 49 mL de fase móvel, preparando-se uma solução 80 µg/mL, da qual se retirou 5 mL, que foi filtrado e transferido para um vial.

A quantificação dos fármacos foi feita por HPLC, utilizando-se coluna C₁₈ - 15 cm, equipamento Waters, módulo 2695 e detector DAD (2996). A fase móvel utilizada foi metanol (A) e água (B), volume de injeção 10 µL, eluição gradiente, variando metanol (40% - 100%) (QUADRO 7) e tempo de corrida 21 minutos.

QUADRO 6: Composição do FGS e FIS

Fluido gástrico simulado	2g NaCl 3,2g Pepsina 7,0mL HCl PA Água destilada qsp 1000mL pH 1,2 (ajustado com HCl 0,1M ou NaOH 0,1M)
Fluido intestinal simulado	250mL Fosfato de potássio monobásico 0,2M 3,6mL de NaOH 0,2M Água destilada qsp 1000mL pH 6,8 (ajustado com HCl 0,1M ou NaOH 0,1M)

FONTE: USP 27.

QUADRO 7: Sistema de eluição gradiente

Tempo (minutos)	Proporção do solvente da fase móvel
0	A (40%) e B (60%)
6	A (60%) e B (40%)
11	A (100%) e B (0%)
14	A (40%) e B (60%)
21	A (40%) e B (60%)

A estabilidade da naringina em FGS e FIS foi determinada em função da redução da concentração do fármaco em cada meio em relação ao tempo de exposição, e da quantificação de naringenina, seu principal produto de degradação.

4.2.3 Desenvolvimento Farmacotécnico

Comprimidos de naringina, contendo 5, 10 e 25 mg de fármaco, foram preparados através do método de granulação via seca, em compressora espiral, utilizando conjunto de matrizes e punções côncavos. A formulação foi composta por naringina, estearato de magnésio 2%, dióxido de silício coloidal (Aerosil – Degussa) 1%, celulose microcristalina (Microcel MC 102 – Blanver Farmoquímica) 80%, lauril sulfato de sódio

2% e talco q.s.p. Cápsulas de naringina foram preparadas com os mesmos excipientes citados acima, cápsula tipo “dura” nº 04 e utilizando encapsuladora manual.

4.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os excipientes selecionados para o desenvolvimento dos comprimidos e cápsulas, bem como a naringina e misturas 1:1 do fármaco com os adjuvantes, foram submetidos a ensaio termoanalítico de calorimetria exploratória diferencial. Foram obtidos também curvas DSC da mistura física dos componentes antes da compressão. Utilizou-se naringina $\geq 90\%$ de pureza. As curvas foram obtidas através de equipamento TA Instruments, sob as seguintes condições experimentais: atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/minuto, razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{minuto}$, da temperatura ambiente até 300°C ; cápsula de alumínio parcialmente fechada e massa em torno de 1,5 mg. A célula DSC foi calibrada antes dos ensaios no eixo de temperatura utilizando padrões de índio (temperatura de fusão = $156,6^\circ\text{C}$) e zinco (temperatura de fusão = $419,5^\circ\text{C}$) metálicos com pureza de 99,99%.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes ao teste e perfil de dissolução dos fármacos naringina e naringenina estão demonstrados na TABELA 1 e TABELA 2. Os resultados foram expressos individualmente e pela média de seis determinações.

TABELA 1 Percentagem de naringina (NA) e naringenina (NG) dissolvida em 45 minutos.

Cubas	NA (%)	NG (%)
1	98,22	38,62
2	96,03	37,45
3	93,32	38,40
4	98,77	35,76
5	97,55	37,33
6	97,70	38,09
Média + DP	95,26 \pm 3,59	37,60 \pm 0,94

TABELA 2 Percentagem de naringina (NA) e naringenina (NG) dissolvida em função do tempo.

Tempo (minutos)	NA (%)	NG (%)
1	31,88	1,90
5	51,46	9,18
7	57,97	12,64
10	77,57	18,01
15	78,10	23,03
20	87,37	23,38
30	91,39	28,23
60	93,06	39,77
90	93,32	41,62
120	96,90	46,94
180	98,22	49,36
240	99,02	52,66

Os resultados referentes ao teste de dissolução demonstraram que, ao contrário da naringina, a naringenina apresentou taxa de dissolução baixa ($37,60 \pm 0,94\%$) para o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação convencional de uso oral. Para FFSO, em função das condições fisiológicas do trato gastrintestinal (trânsito gástrico e intestinal), espera-se que ocorra dissolução de no mínimo 70% do fármaco em até 45 minutos.

De acordo com a literatura, os flavonóides glicosilados, como a naringina, apresentam maior absorção do que quando não estão conjugados com açúcares, Tal fato, se explica, em função da dificuldade de solubilização dos flavonóides na forma aglicona. Estudos demonstraram que a quercetina tem absorção de 24% e a Hesperidina, onde há a presença de rutinose em sua estrutura, tem absorção de 52% (HAVSTEEN, 2002).

Os perfis de dissolução foram obtidos através de coletas seriadas de amostras em intervalos de tempo pré-definidos, para naringina e naringenina, e estão ilustrados na FIGURA 4. Os valores de percentagem dos fármacos dissolvidos em função do tempo,

comprovaram a baixa solubilidade aquosa da naringenina em comparação com a naringina.

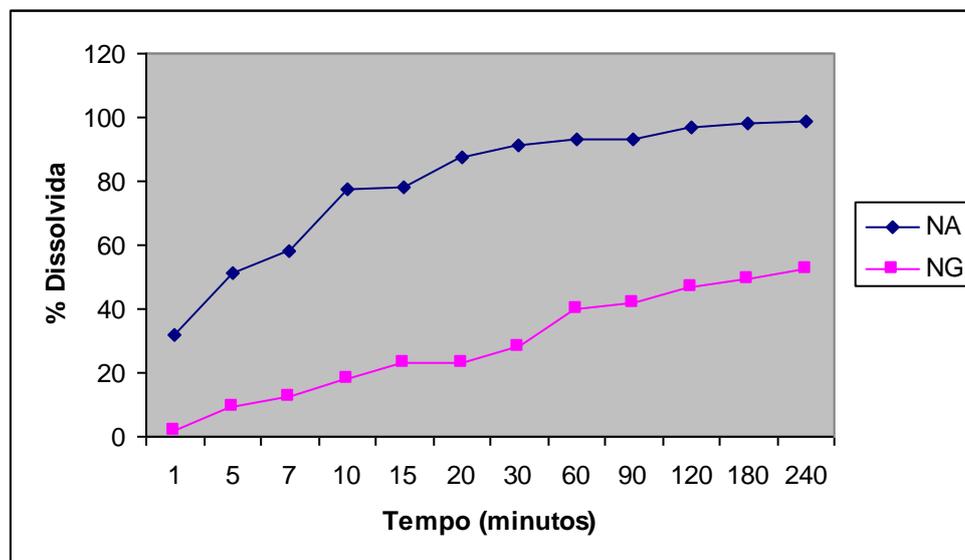


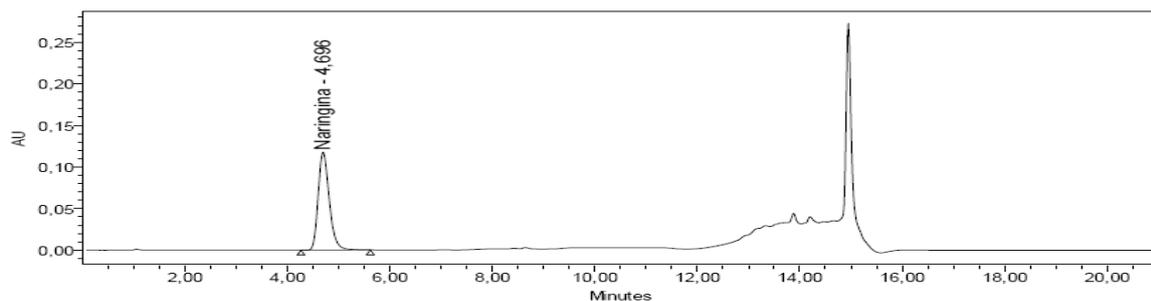
FIGURA 4 Perfis de dissolução da naringina (NA) e naringenina (NG) em água.

Na avaliação da estabilidade gástrica e intestinal da naringina realizou-se a determinação quantitativa desse flavonóide por HPLC, após um período de exposição do padrão do fármaco ao FGS e ao FIS. A TABELA 3 demonstra os resultados da quantificação de naringina remanescente após a exposição aos meios FGS e FIS. A FIGURA 5 apresenta os cromatogramas da naringina na avaliação da estabilidade ao FGS.

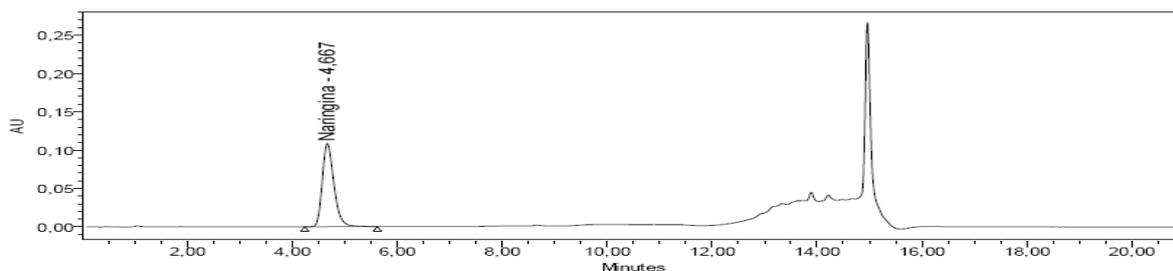
TABELA Teor (em $\mu\text{g}/\text{mL}$) de NA após exposição aos meios FGS e FIS

Tempo (minutos)	FGS	FIS
0	80,0	80,0
30	77,46	79,56
60	75,26	77,34
90	74,84	77,21
120	74,53	75,67
240	-	74,99

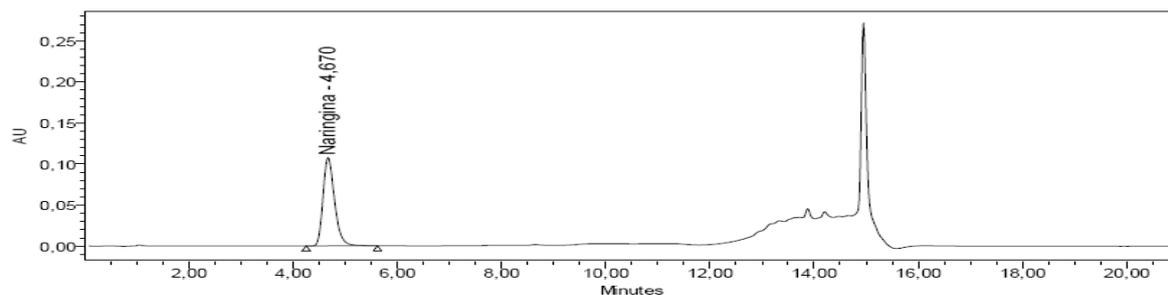
(A)



(B)



(C)



(D)

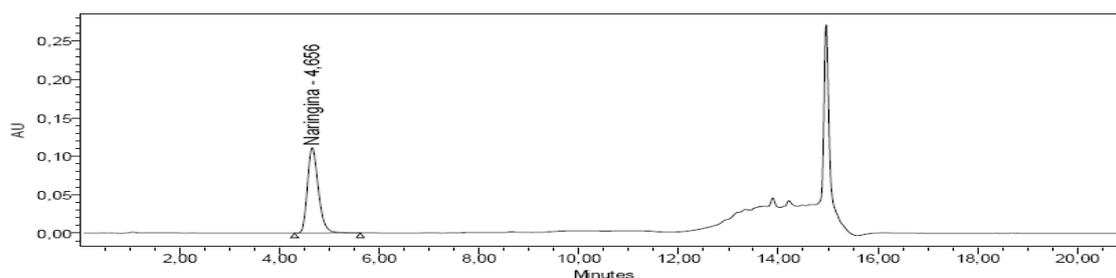


FIGURA 5: Cromatogramas de concentração da Naringina em função do tempo de exposição ao fluido gástrico simulado: (A) Tempo 0; (B) Tempo 60 minutos; (D) Tempo 90 minutos e (E) Tempo 120 minutos.

Os resultados obtidos demonstraram que a naringina é estável em meio gástrico e intestinal. Após 120 minutos de exposição ao FGS houve redução na concentração do fármaco de aproximadamente 6,83%; e 6,26%, após 240 minutos de contato com FIS. Além disso, não se detectou a presença de naringenina, principal metabólito da naringina,

em nenhuma das quantificações realizadas. A naringina é metabolizada no trato gastrointestinal, por ação de enterobactérias. Esperava-se que as enzimas presentes nos fluidos gastrintestinais também exercessem alguma atividade sobre o seu metabolismo. Entretanto, neste trabalho foi possível perceber que a hidrólise da naringina ocorre, restritamente, devido à presença de enzimas bacterianas.

Na FIGURA 6 esta representada a curva DSC para a naringina. Pode-se observar um evento endotérmico a 76,75° C, correspondente a fusão do fármaco. A fusão caracteriza-se por fenômeno físico, o qual pode ser detectado através das curvas de DSC.

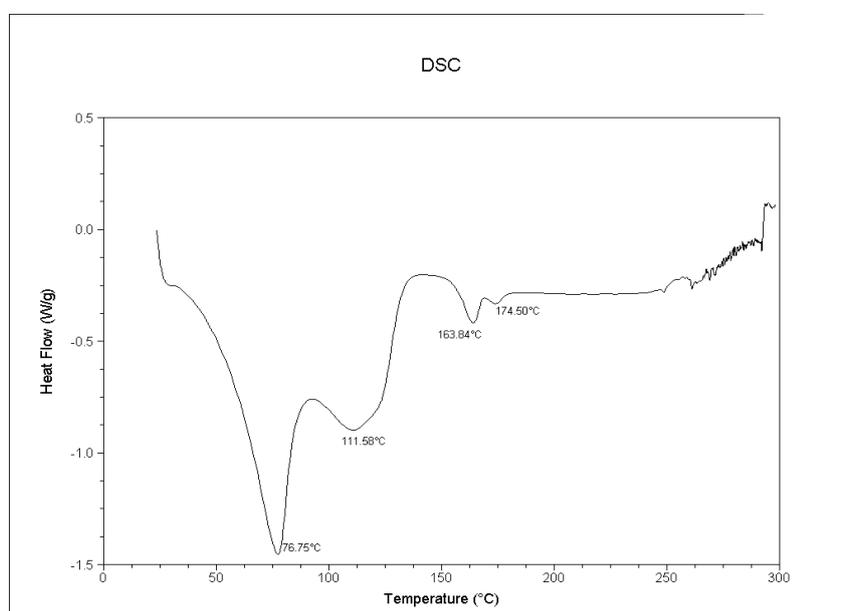
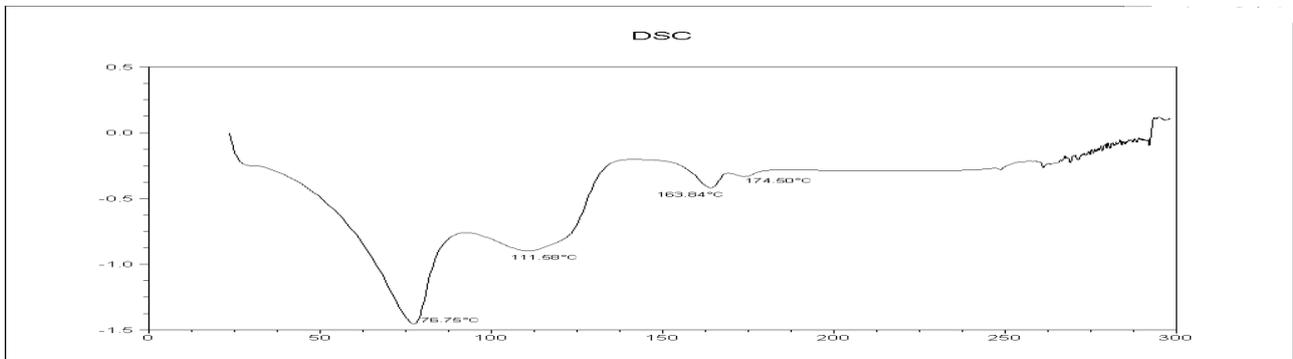


FIGURA 6 Curva DSC da naringina obtida sob atmosfera dinâmica de nitrogênio e razão de aquecimento de 10° C/minuto.

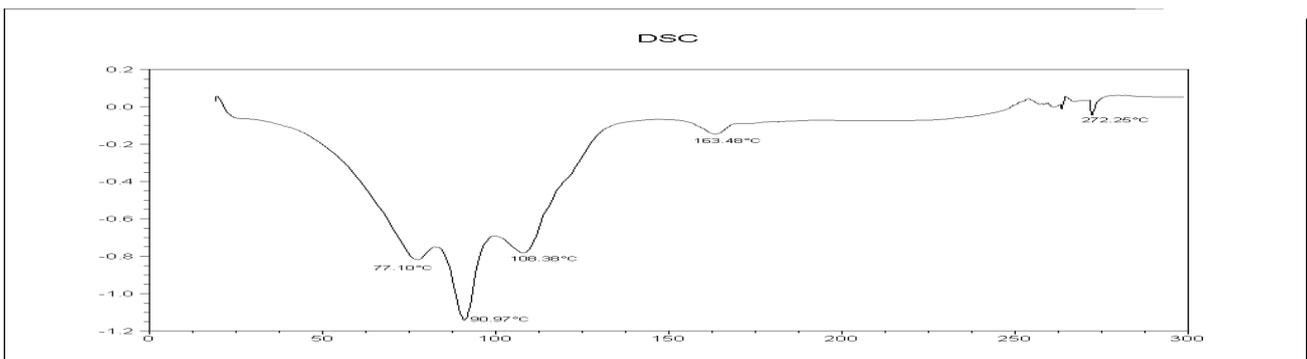
O comportamento térmico do fármaco isolado, dos excipientes e das misturas fármaco-excipientes foi comparado nos termogramas obtidos. Em algumas misturas, a fusão da naringina foi bem preservada, com ligeiras alterações em termos de alargamento do pico ou alteração na temperatura de fusão. Tem sido relatado que em função da quantidade de material utilizado e da pureza das amostras, especialmente em misturas fármaco-excipiente, podem ocorrer alterações de entalpia, e essas mudanças são devido à mistura entre as substâncias, que reduz o grau de pureza de cada componente, não caracterizando necessariamente uma incompatibilidade química (VERMA & GARG, 2005).

As curvas DSC das misturas físicas do fármaco com os excipientes: celulose microcristalina, estearato de magnésio, lauril sulfato de sódio, aerosil e talco estão representadas na FIGURA 7.

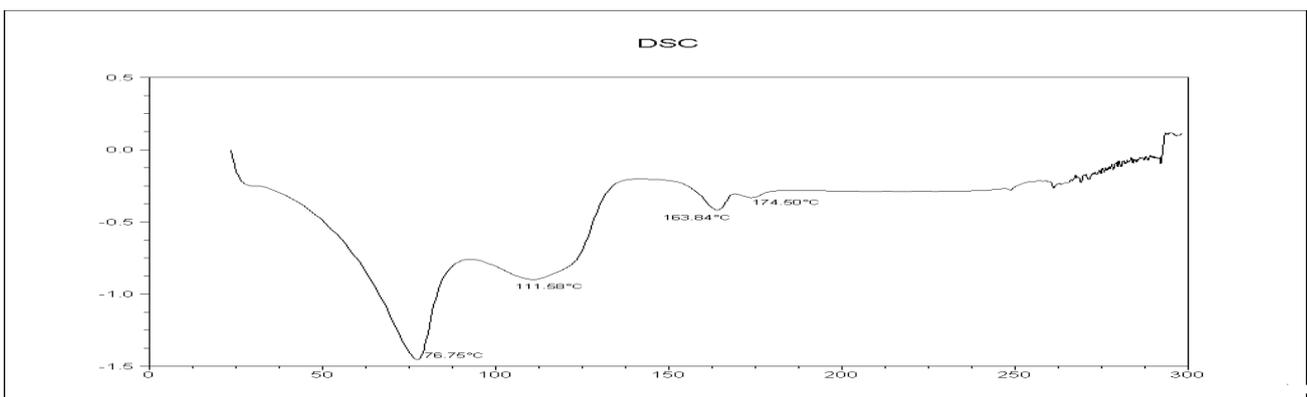
(1)



(2)



(3)



(4)

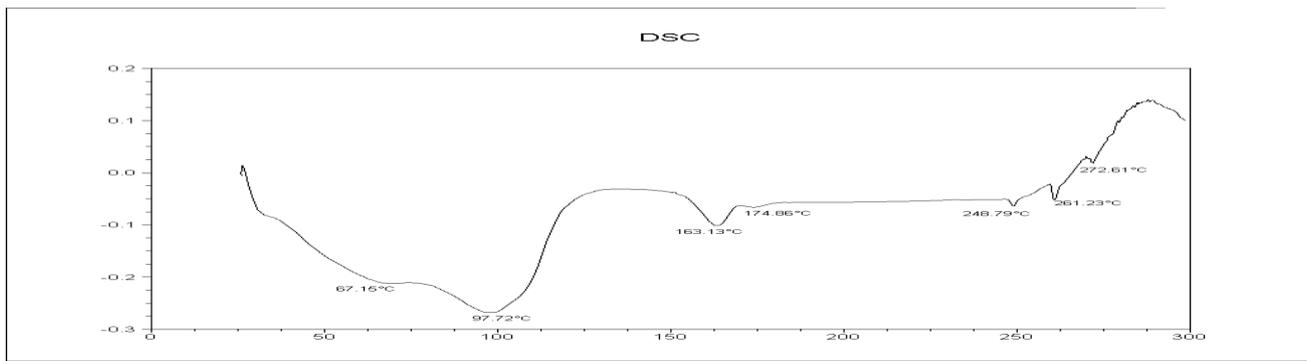


FIGURA 7 Curva DSC da mistura 1:1 da naringina com celulose microcristalina (1), estearato de magnésio (2), lauril sulfato de sódio (3) e talco (4) obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio e razão de aquecimento de 10° C/ minuto.

A curva DSC da celulose microcristalina mostrou um amplo pico endotérmico a 68,57° C. O termograma da mistura naringina-celulose microcristalina mostrou um pico em 77,46° C atribuído a naringina, demonstrando que não houve interação entre o fármaco e a celulose microcristalina.

No DSC do estearato de magnésio foi observado um pico endotérmico em 92,03° C. Na curva DSC naringina-estearato de magnésio foi observado a presença de vários picos que não puderam ser correlacionados a naringina ou ao estearato de magnésio, porém foram atribuídos a impurezas presentes na amostra de estearato de magnésio.

O termograma do lauril sulfato de sódio mostrou um amplo pico endotérmico em 193,70° C, e outros três picos menores, indicando a presença de impurezas nas amostras. Na curva DSC da mistura de naringina com esse excipiente observou-se um pico em 76,75° C atribuído a naringina, demonstrando que não houve incompatibilidade farmacotécnica..

Na curva DSC do aerosil (dióxido de silício coloidal) e do talco não foram observados picos endotérmicos ou exotérmicos na faixa entre 25°-300° C. O pico de naringina foi bem preservado na mistura física naringina-aerosil, demonstrando compatibilidade entre o flavonóide e o excipiente. O termograma da mistura naringina-talco apresentou um amplo pico endotérmico na faixa de temperatura entre 60°-100° C e outros picos menores a partir de 150° C. Como o pico referente a fusão da naringina se manteve, o fármaco e o excipiente foi considerado compatível.

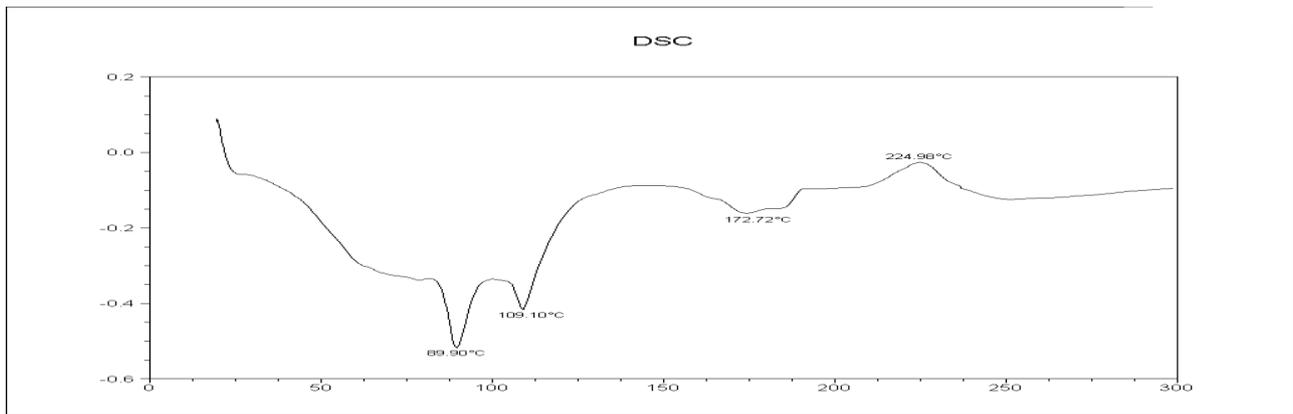


FIGURA 8 Curva DSC da mistura naringina-excipientes na proporção descrita no desenvolvimento farmacotécnico dos comprimidos e cápsulas

O termograma da mistura física naringina-excipiente, nas proporções descritas no desenvolvimento farmacotécnico, está representado na FIGURA 8. Foi observado um pico exotérmico a 89,9°C, atribuído a naringina, e a presença de outros picos acima de 100° C. Esse resultado indica que os excipientes selecionados, nas proporções determinadas na formulação proposta, seriam compatíveis.

4.4 CONCLUSÕES

A partir do teste e do perfil de dissolução dos fármacos naringina e naringenina foi possível concluir que o primeiro, por apresentar maiores taxas de solubilidade aquosa e maior percentagem de cedência, está mais indicado para a administração por via oral. De acordo com resultados encontrados, a naringenina, se veiculada em formas farmacêuticas sólidas, apresentará baixa biodisponibilidade.

O estudo do perfil cinético de degradação da naringina, em condições fisiológicas simuladas, demonstrou que o fármaco é estável nos fluidos gastrintestinais. Na avaliação da estabilidade, pode-se concluir que as variações no pH e na composição das enzimas presentes no estômago e intestino não alteram a estabilidade do fármaco. A naringina não é degradada pelas enzimas gastrintestinais, o que vem confirmar a sua predisposição a administração em formas farmacêuticas para uso oral.

A avaliação da interação entre a naringina e os excipientes selecionados para as formulações de comprimidos e cápsulas, através da calorimetria exploratória diferencial, permitiu concluir que os excipientes na formulação proposta são compatíveis. O lauril sulfato de sódio, por ter sugerido possível incompatibilidade, nas misturas 1:1, foi retirado

da formulação inicialmente proposta para o preparo de comprimidos e cápsulas de naringina, pois requer outros estudos complementares, como o infravermelho, por exemplo, para confirmar a compatibilidade.

O estudo de compatibilidades entre fármacos e excipientes é um processo importante no desenvolvimento de medicamentos. Incompatibilidades podem alterar a estabilidade e a biodisponibilidade dos princípios ativos, bem como a eficácia e segurança dos mesmos.

Referências

1. ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR., L.V. *Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 6 ed. São Paulo: Premier, 2000. 586 p.
2. ASAFU-ADJAYE, E.B.; FAUSTINO, P.J.; TAWAKKUL, M.A.; ANDERSON, L.W.; YU, L.X.; KWON, H.; VOLPE, D.A. *Validation and application of a stability-indicating HPLC method for the in vitro determination of gastric and intestinal stability of venlafaxine*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 43: 1854-1859, 2007.
3. BAZZO, G.C.; SILVA, M.A.G. *Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 41(3): 315-322, 2005.
4. BHATTARAI, S.; TRAN, V.H.; DUKE, C.C. *Stability of [6]-gingerol and [6]-shogaol in simulated gastric and intestinal fluids*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 45: 648-653, 2007.
5. FRANCELINO, E.V.; SILVA, A.V.A.; FONSECA, F.G.C.; ARRAIS, P.S.D. *Presença de excipientes com potencial para a indução de reações adversas em medicamentos comercializados no Brasil*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 44(3): 397-405, 2008.
6. HAVSTEEN, B.H. *The biochemistry and medical significance of the flavonoids*. **Pharmacol. Therap.** 96: 67-202, 2002.
7. KANAZE, F.I.; KOKKALOU, E.; NIOPAS, I.; GEORGARAKIS, M.; STERGIU, A.; BIKIARIS, D. *Thermal analysis study of flavonoid solid dispersions having enhanced solubility*. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. 83(2): 283-290, 2006.
8. LONGER, M.A.; ROBINSON, J.R. *Sistema de liberação sustentada de drogas*. In: GENARO, A.R. *Remington: Farmácia*. 17 ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana, 1995, v.2.

9. PEZZINI, B.R.; SILVA, M.A.S.; FERRAZ, H.G. *Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 43 (4): 491-502, 2007.
10. SILVA, E.C.; PAOLA, M.V.R.V.; MATOS, J.R. *Análise térmica aplicada a cosmetologia*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 43 (3): 347-356, 2007).
11. UNITED States Pharmacopeia: USP 27: The National Formulary: NF 22. Rockville: United States.
12. VERMA, R.K.; GARG, S. *Selection of excipientes for extended release formulations of glipizide through drug-excipient compatibility testing*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 38: 633-644, 2005.

**5 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
BIOFARMACOTÉCNICA DE COMPRIMIDOS E
CÁPSULAS DE NARINGINA**

5.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento farmacotécnico de medicamentos envolve um conjunto de fatores inerentes à sua tecnologia de produção e ao controle de qualidade. A garantia dessa qualidade deve assegurar a eficácia terapêutica dos mesmos. Entretanto, a eficácia clínica de um fármaco não é atribuída apenas à sua atividade farmacológica intrínseca. Fatores ligados a suas propriedades físico-químicas, bem como aqueles relacionados aos excipientes empregados na formulação, além do processo de manufatura, tem sido considerados como responsáveis por alterações no efeito dos medicamentos, uma vez que pode afetar a sua biodisponibilidade (STORPIRTIS, 1993).

Nas últimas décadas, têm-se estudado outras vias de administração de fármacos, mas a via oral ainda continua sendo preferencial. Os compostos para serem administrados oralmente devem ter adequada solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal, de forma a atingir sua concentração terapêutica na circulação sistêmica. A ineficácia clínica observada com o uso de alguns medicamentos, além de episódios de intoxicação, deram origem às investigações relacionadas à biodisponibilidade de produtos farmacêuticos. Estudos mostraram que variações na formulação ou na técnica de fabricação, podem gerar diferenças substanciais na absorção e, conseqüentemente, na resposta terapêutica dos fármacos. Essas modificações podem ser monitoradas *in vitro* pelo perfil de dissolução, por meio da quantificação da fração do fármaco dissolvido e *in vivo* pela sua concentração plasmática, ambas em função do tempo. Os dados *in vivo* permitem determinar a biodisponibilidade do fármaco (SOUZA *et al.*, 2007).

Problemas de biodisponibilidade com determinados fármacos podem ser reflexos de que a absorção ocorre durante um período de tempo limitado após a ingestão, o que implica, igualmente, que o processo de dissolução no trato gastrointestinal (TGI) seja limitado pelo tempo, devendo assim, ser estudado o tempo crítico para se atingir percentagem ótima de fármaco dissolvido no local de absorção (AMIDON *et al.*, 1995; DRESSMAN, 1997).

A liberação do fármaco de uma forma farmacêutica sólida pode envolver três etapas fundamentais: desintegração, desagregação e, finalmente, dissolução. Esses

processos podem ocorrer simultaneamente, com conseqüente liberação do fármaco. A velocidade pelo qual o processo de dissolução ocorre determinará, portanto, a liberação do fármaco e a sua absorção (SERRA & STORPIRTIS, 2007).

Os modelos que permitem prever a absorção dos fármacos a partir dos estudos de dissolução estão limitados pela complexidade de fenômenos que ocorrem no trato gastrointestinal (TGI), tais como, a situação de jejum ou pós-prandial, a motilidade, o esvaziamento gástrico, o conteúdo do lúmen intestinal, o mecanismo responsável pela absorção do fármaco e permeabilidade e alterações físico-químicas da molécula ao longo do TGI (RAMA *et al.*, 2007).

Os testes de dissolução para formas farmacêuticas sólidas foram inicialmente incluídos na Farmacopéia Americana na década de 1960, com o objetivo de avaliar a cedência do fármaco. Esses estudos representam uma ferramenta indispensável para várias etapas dos processos de desenvolvimento farmacotécnico de medicamentos, permitindo verificar a estabilidade das formulações. Na área de produção farmacêutica e controle de qualidade, os resultados do teste de dissolução podem ser empregados para detectar desvios de fabricação, uniformidade durante a produção e reprodutibilidade lote a lote (MARQUES, 2002).

Com relatos sobre ineficácia clínica e intoxicações, frequentemente observados com o uso de alguns medicamentos, consolida-se a biofarmacotécnica (ou biofarmácia) que se dedica ao estudo dos fatores físicos e físico-químicos relacionados ao fármaco, em sua forma farmacêutica, e a influência que a formulação exerce sobre a liberação do fármaco no organismo. A participação desses fatores nas características de biodisponibilidade do fármaco é observada, principalmente, quando a forma farmacêutica é sólida (cápsulas, comprimidos, comprimidos revestidos, drágeas, etc.). As FFSO são as que apresentam maiores problemas relativos à biodisponibilidade, uma vez que, nesses casos, faz-se necessária a liberação do mesmo da formulação, para posterior absorção. Os estudos biofarmacotécnicos permitem tanto o desenvolvimento racional das formulações, baseado nas propriedades farmacêuticas, como a avaliação daquelas já existentes.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Padronização de método analítico para a determinação de naringina em formas farmacêuticas sólidas

5.2.1.1. Preparo da solução padrão

Utilizou-se padrão de naringina Sigma Aldrich (St. Louis, EUA), com pureza $\geq 90\%$, para o preparo de soluções-padrões. Quantidade adequada de padrão foi pesada, dissolvida e diluída em metanol (Vetec[®]), para obter a concentração final de 1 mg/mL. Essa solução foi usada como solução padrão estoque. A partir dessa, foram preparadas as curvas de calibração e os padrões das análises.

5.2.1.2. Preparo da solução padrão

A curva de calibração foi elaborada a partir de diluições volumétricas da solução estoque, utilizando metanol:água milli-Q (50:50) como diluente. As concentrações resultantes foram 0,004; 0,0054; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 mg/mL.

5.2.1.3. Preparo da solução amostra

Pesou-se quantidade de comprimidos e cápsulas pulverizados equivalente a 200 mg de naringina e transferiu para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com metanol e agitou-se em banho de ultra-som por 15 minutos. Filtrou-se a amostra e obteve-se uma solução na concentração de 2 mg/mL. Dessa solução, tomou-se alíquota de 1 mL, transferiu-se para balão volumétrico de 200 mL, completou-se com metanol:água milli-Q (50:50), obtendo a concentração de 0,01 mg/mL.

5.2.1.4. Condições cromatográficas

A fase móvel consistiu em metanol (A):água (B) e cada solvente foi filtrado através de um filtro de polipropileno com 0,2 μm de poro, e degazeificados em banho de ultra-som antes do uso. A separação foi realizada usando eluição gradiente: 0-8 min. 23% A; 8-15 min. 23-65% A linear; 15-20 min. 65-70% A linear; 20-21 min. 70-23% A linear; 21 -22

min. 23% A. O detector (DAD) foi fixado em 200-400 nm de comprimento de onda. As análises foram realizadas a 25° C, fluxo 1 mL/minuto e volume de injeção de 25 µL.

5.2.1.5. Validação

A especificidade do método foi avaliada analisando-se comprimidos: placebo, contendo estearato de magnésio, aerosil, celulose microcristalina, lauril sulfato de sódio, talco, e naringenina. A preparação da curva de linearidade foi realizada a partir de três curvas autênticas, nas concentrações: 0,004; 0,0054; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 mg/mL de naringina. Os resultados foram tratados estatisticamente pelo método de mínimos quadrados, obtendo-se a regressão linear. A faixa de concentração testada correspondeu entre 40 e 160% da concentração em teste.

A precisão foi determinada realizando-se seis determinações (três injeções cada) a 100% da concentração teste (0,01 mg/mL). Foi considerado como limite máximo um valor de desvio padrão relativo (DPR) de 2%. A exatidão foi determinada após avaliação da precisão, linearidade e especificidade.

O limite de quantificação foi obtido a partir de diluições sucessivas (50,0 a 1,0 µg/mL), considerando como a menor concentração onde o DPR entre as injeções é inferior a 2%.

O ensaio de robustez foi determinado a partir da variação dos seguintes parâmetros: fluxo da fase móvel (0,7 – 1,1), fornecedor de solvente (Vetec® e J.T. Baker®) e temperatura do forno (20-30° C). Foram realizadas análises das amostras em triplicata para todos os parâmetros da robustez.

5.2.2 Ensaio Físicos e Físico-químicos

Foram realizados os ensaios físicos e físico-químicos para avaliação dos comprimidos e cápsulas de naringina, descritos para formas farmacêuticas sólidas nos compêndios oficiais. Avaliou-se três lotes de comprimidos e cápsulas de naringina desenvolvidos no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com teor declarado de 5 mg, 10 mg e 25 mg. Os lotes desenvolvidos receberam a seguinte denominação:

- Lote A1: Comprimidos de naringina 5 mg;
- Lote A2: Comprimidos de naringina 10 mg;
- Lote A3: Comprimidos de naringina 25 mg;
- Lote B1: Cápsulas de naringina 5 mg;
- Lote B2: Cápsulas de naringina 10 mg;
- Lote B3: Cápsulas de naringina 25 mg;

5.2.2.1. Peso médio

O peso de cada unidade (comprimido e cápsula) foi determinado, individualmente, a partir de 20 unidades, aleatoriamente separadas, de cada lote, e a média dos pesos foi obtida conforme descrito na Farmacopéia Brasileira 4^a ed. (1988).

5.2.2.2 Dureza

A dureza dos comprimidos foi determinada individualmente, a partir de 10 unidades aleatórias de cada lote, utilizando-se durômetro de mola espiral e obtido conforme descrito na Farm. Bras. 4^a ed.

5.2.2.3 Teor de naringina nas amostras

O teor de naringina nas amostras foi determinado segundo item 5.2.1.

5.2.2.4 Friabilidade

A friabilidade dos comprimidos foi avaliada a partir de 20 unidades aleatórias de cada lote, utilizando friabilômetro (Nova Ética[®]) ajustado com 20 rpm, por um período de 5 minutos. A determinação da percentagem de massa perdida nas unidades testadas após o teste, foi realizada através da diferença de massa antes e o após o teste.

5.2.2.3 Desintegração

Os tempos de desintegração das cápsulas e comprimidos de naringina foram determinados a partir de 6 unidades aleatoriamente separadas de cada lote, usando

aparelho para desintegração (Nova Ética[®]) e água, ácido clorídrico 0,1 M e tampão fosfato (pH 6,8) na temperatura $37 \pm 1^\circ \text{C}$, como meio de desintegração.

5.2.2.6 Teste e perfil de dissolução

As condições para o teste e perfil de dissolução estão especificadas no QUADRO 8.

QUADRO 8 Condições para o teste e perfil de dissolução de comprimidos e cápsulas de naringina

Temperatura	$37 \pm 0,5^\circ \text{C}$
Aparato de agitação	1 (cesta) para cápsulas e 2 (pá) para comprimidos
Velocidade de agitação	100 rpm
Volume de meio	900mL
Alíquota amostrada	10 mL
Detecção	espectroscopia no UV (284 nm)

Como meio de dissolução foi utilizado: água destilada e desgaseificada, ácido clorídrico 0,1M e tampão fosfato pH 6.8. Os meios de dissolução foram filtrados em filtro de $0,5 \mu\text{m}$ e em seguida, submetidos a banho de ultra-som por 15 minutos para remoção de gás (degaseificação).

Os perfis de dissolução foram construídos a partir da quantificação da naringina, em amostras dos lotes A3 e B3, dissolvida nas cubas de dissolução, em intervalos de tempo pré-definidos. Padronizou-se coletas de alíquotas dos meios nos tempos: 1, 3, 5, 17, 10, 15, 20, 30, 40 e 60 minutos, e, a cada tomada de ensaio, o meio de dissolução foi repostado. As alíquotas amostradas foram filtradas em filtros de $0,5 \mu\text{m}$, imediatamente após a amostragem.

O teste de dissolução foi realizado a partir da quantificação do fármaco dissolvido nas cubas de dissolução, utilizando amostras dos seis lotes desenvolvidos, após a amostragem de um ponto único do meio de dissolução (45 minutos após o início do teste).

A concentração de naringina dissolvida foi obtida por espectrofotometria no ultravioleta (UV) em comprimento de onda de 284nm. As amostras foram retiradas da cuba e diluídas em metanol para quantificação. Foi preparada curva de calibração com padrões de naringina nas concentrações 0.027, 2.7, 13.5, 27, 32, 54, 128, 256, 512 e 1024 µg/mL utilizando metanol e água (50:50) como diluente. Os valores de absorvância obtidos foram comparados com a curva de calibração e utilizou-se a equação da reta para determinação das concentrações de naringina dissolvidas. Os resultados foram expressos como média de três determinações.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A naringina apresentou pico máximo de absorção em 284 nm. A TABELA 4 e a FIGURA 9 apresentam os resultados referentes à curva de calibração obtida a partir de diferentes diluições do padrão do fármaco e quantificação por HPLC. A análise de regressão possibilitou a obtenção da equação da reta de calibração, e de alto e significativo coeficiente de correlação ($r=0,9989$), demonstrando que o método é linear no intervalo analisado.

TABELA 4 Curva de calibração obtida a partir da análise da naringina por HPLC

Naringina (µg/mL)	Área	Desvio-padrão
4,0	212066	0,435
5,4	302258	0,577
10,0	497407	0,763
20,0	1051304	0,057
40,0	2109199	0,173
80,0	4025540	0,513
160,0	8299364	0,346
320,0	15498180	0,305

Os resultados correspondem à média de três determinações.

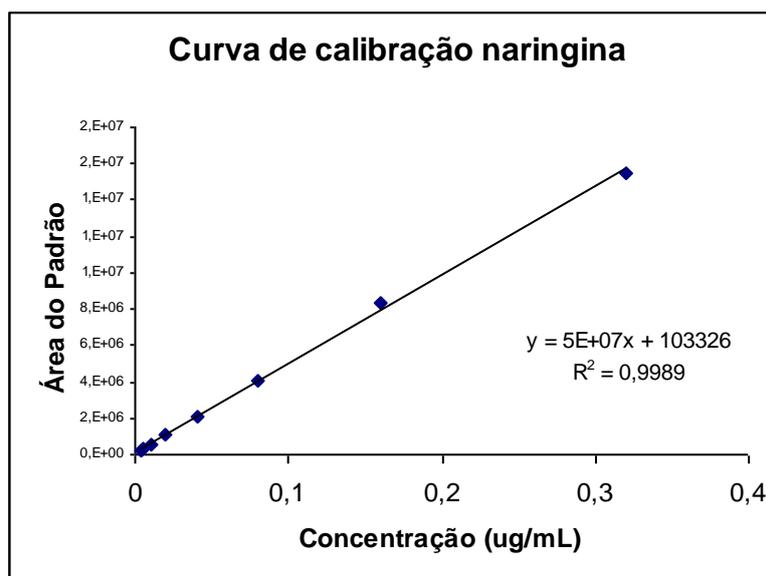


FIGURA 9 Curva de calibração da naringina

O método desenvolvido apresentou boa separação do analito e dos excipientes utilizados na formulação. O sinal cromatográfico referente à naringina apresentou adequada resolução, com tempo de retenção de 4,36 minutos, demonstrando que o método é específico (FIGURA 10).

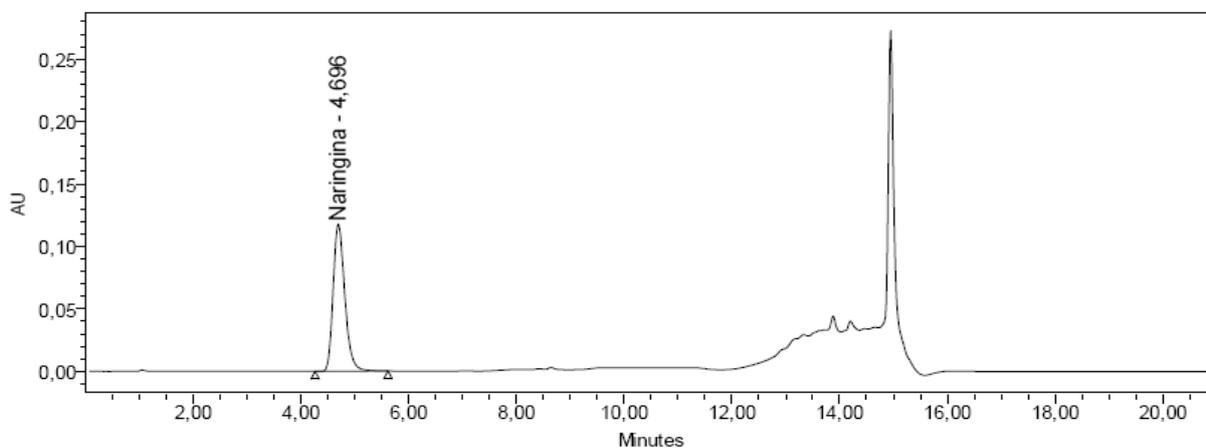


FIGURA 10 Cromatograma de solução amostra na concentração de 0,01 mg/mL, onde se observa pico relativo à naringina no tempo de retenção de 6,36 minutos.

A TABELA 5 apresenta os resultados referentes à precisão do método de quantificação da naringina por HPLC. O método mostrou-se preciso, com DPR de 0,827%. Os valores obtidos mostraram que a análise foi reprodutível.

TABELA 5 Valores de área utilizados no cálculo de precisão

Análise	1	2	3	4	5	6
	538066	528855	537982	537891	539123	535677
	538064	538849	537988	537095	538995	545684
	538863	528999	537969	537076	539087	548051
Média	538017,4					
DPR	0,827					

O método desenvolvido demonstrou boa separação entre o analito e os demais componentes das formulações. Os sinais cromatográficos referentes à naringina apresentaram adequada resolução, com tempo de retenção de 4,36 minutos. A exatidão do método foi demonstrada, pois os parâmetros precisão, linearidade e especificidade foram previamente estabelecidos. Foi considerado como limite de quantificação inferior a concentração de 3,0 µg/mL, pois essa foi a mais baixa concentração onde o DPR era inferior a 2,0%.

A variação dos parâmetros fluxo de fase móvel, fornecedores de solventes e temperatura não alteraram de forma significativa os valores de área da naringina, demonstrando que o método é robusto.

TABELA 6 Peso médio e dureza, expressos como média ± desvio-padrão

Lote	Peso médio (mg) n= 20	Dureza (N) n=10*
A1	201,79	52,8
A2	211,34	55,7
A3	233,00	65,8
B1	134,88	-
B2	127,56	-
B3	138,10	-

* A dureza foi avaliada apenas para os lotes de comprimidos.

A TABELA 6 apresenta os resultados referentes ao peso médio e dureza dos produtos: A (lote 1, 2 e 3) e B (lote 1, 2 e 3). Em relação ao peso médio e dureza, os lotes desenvolvidos se mostraram de acordo com as especificações da Farm. Bras. 4ª ed.

A friabilidade é a falta de resistência de comprimidos à abrasão, quando submetidos à ação mecânica de aparelhagem específica. Na avaliação da friabilidade dos lotes de naringina desenvolvidos, obteve-se as seguintes porcentagens de perda de massa após o teste: 0,104% para o lote A1, 0,170% para A2 e 0,102% para A3. Segundo a Farm. Bras. 4ª. ed. considera-se aceitáveis os lotes de comprimidos com perda inferior a 1,5% do seu peso. Portanto, os lotes analisados estavam em conformidade com as especificações.

A TABELA 7 mostra os resultados dos tempos de desintegração dos lotes desenvolvidos. Todos os lotes foram considerados aprovados, pois de acordo com os compêndios oficiais, todas as unidades testadas devem desintegrar em no máximo 30 minutos.

TABELA 7 Tempos de desintegração

Lote	Tempo de desintegração (minutos) n=6
A1	6,3
A2	5,5
A3	6,0
B1	3,0
B2	3,1
B3	3,5

A TABELA 8 demonstra os resultados referentes aos teores de naringina nos lotes A e B desenvolvidos. Não há especificações em compêndios oficiais para os limites referentes aos teores de naringina em formas farmacêuticas. Os resultados apresentados foram considerados satisfatórios por estarem próximo a 100% do valor rotulado.

TABELA 8 Teor de naringina nos produtos A (lotes 1, 2 e 3) e B (lotes 1, 2 e 3)

Amostra	Teor (mg/ unidade)	%
A1	5,02	100,56
A2	9,82	98,29
A3	24,97	99,89
B1	4,61	92,25
B2	9,74	97,47
B3	24,44	97,77

A FIGURA 11 apresenta a curva de calibração definida no método para quantificação da porcentagem de naringina dissolvida no teste e perfil de dissolução.

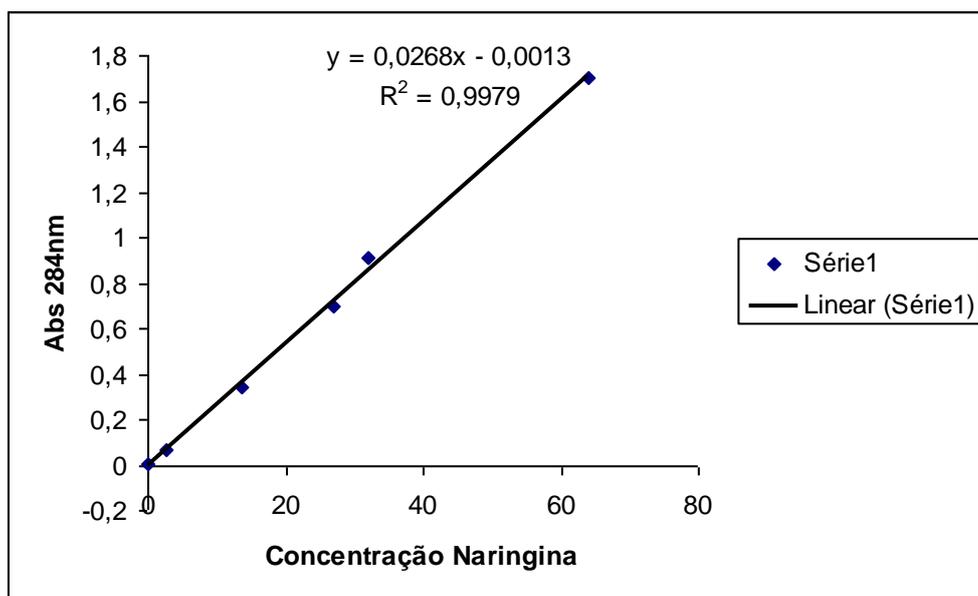


FIGURA 11 Curva de calibração para quantificação de naringina nos meios de dissolução

As TABELAS 9 e 10 demonstram os resultados obtidos no teste de dissolução nas formulações de comprimidos e cápsulas.

TABELA 9 Percentagem de naringina (NA) nas formulações de comprimidos, após teste de dissolução

Cubas	Meios*:	Lote A1 (%)			Lote A2 (%)			Lote A3 (%)		
		água	HCl	Tampão	água	HCl	Tampão	água	HCl	Tampão
1		85,22	88,62	84,33	83,65	87,55	80,56	87,99	89,65	75,66
2		83,32	88,40	81,76	85,12	88,67	81,11	86,74	90,06	74,43
3		88,77	89,76	79,98	86,99	86,59	79,31	85,47	88,94	72,39
4		87,55	87,89	79,37	85,48	89,93	79,12	84,76	86,96	70,82
5		87,70	88,09	80,44	83,55	91,39	78,57	88,51	88,65	73,49
6		87,25	89,64	80,73	86,84	90,09	80,02	86,74	86,00	72,80
Média		86,63	88,73	81,10	85,27	89,03	79,78	86,70	88,37	73,23

* Meios: água desgasificada (água), ácido clorídrico 0,1M (HCl) e tampão fosfato pH 6,8 (tampão).

TABELA 10 Percentagem de naringina (NA) nas formulações de cápsulas, após teste de dissolução

Cubas	Meios*:	Lote B1 (%)			Lote B2 (%)			Lote B3 (%)		
		água	HCl	Tampão	água	HCl	Tampão	água	HCl	Tampão
1		92,26	92,86	96,92	96,35	95,31	91,26	98,49	96,84	92,43
2		96,72	94,48	96,88	96,28	98,71	92,94	94,56	93,52	94,73
3		98,56	99,10	95,86	97,96	96,73	95,31	94,00	92,10	90,42
4		96,78	98,97	95,65	95,78	95,32	89,74	98,49	95,74	90,84
5		96,85	98,04	95,87	96,50	98,37	95,70	97,37	98,36	94,35
6		97,36	98,54	94,59	96,44	98,07	93,30	97,64	97,11	92,29
Média		96,42	96,99	95,96	96,55	97,58	94,70	96,80	95,61	92,51

* Meios: água desgasificada (água), ácido clorídrico 0,1M (HCl) e tampão fosfato pH 6,8 (tampão).

Os perfis de dissolução dos comprimidos (lote A3) e cápsulas (lote B3), contendo 25 mg de naringina, estão ilustrados nas FIGURAS 12, 13 e 14.

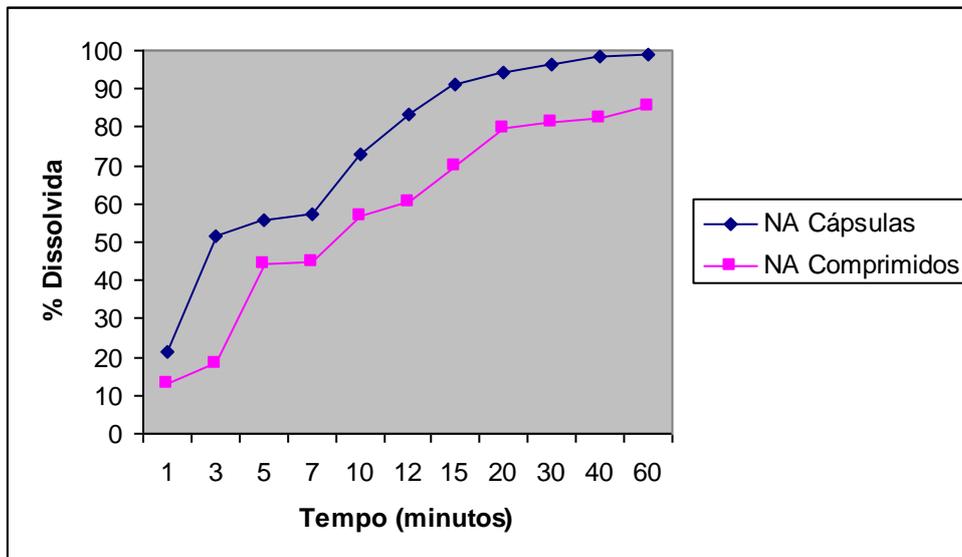


FIGURA 12 Perfis de dissolução de cápsulas e comprimidos de naringina em água

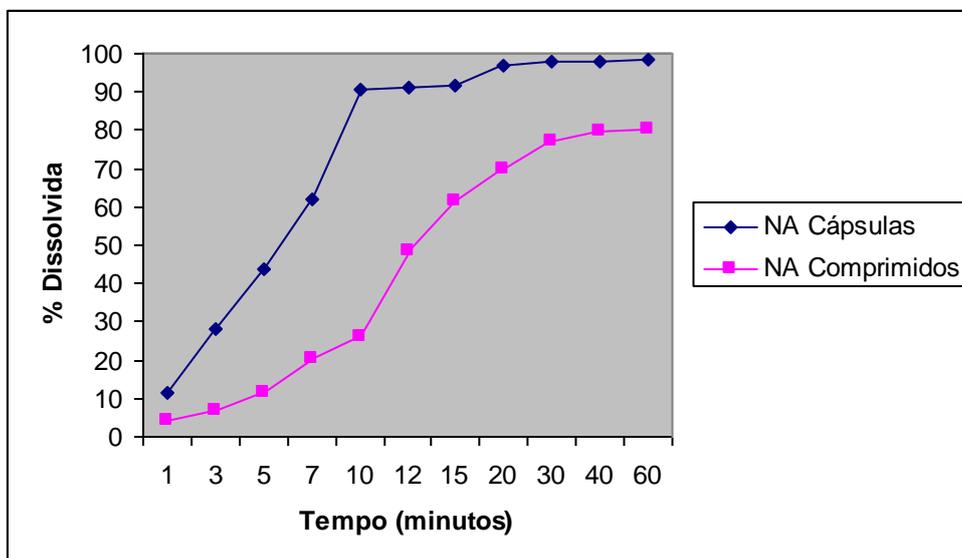


FIGURA 13 Perfis de dissolução de cápsulas e comprimidos de naringina em HCl 0,1M

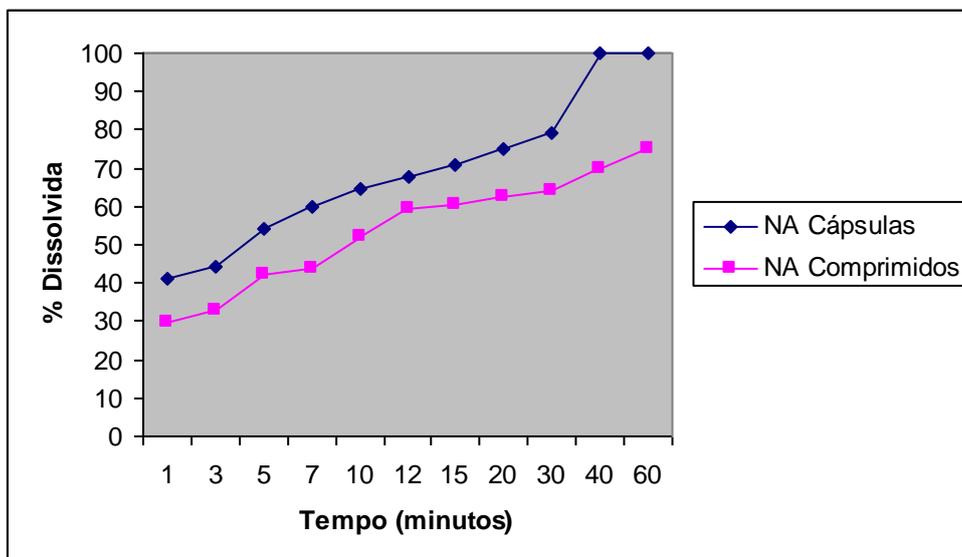


FIGURA 14 Perfis de dissolução de cápsulas e comprimidos de naringina em tampão fosfato pH 6,8

A análise global dos resultados obtidos permite afirmar que as cápsulas de naringina apresentaram maior velocidade e extensão de dissolução quando comparado às amostras de comprimidos.

O estudo do perfil de dissolução dos comprimidos e cápsulas, em comparação com os três meios de dissolução avaliados, demonstrou que ambas as formas farmacêuticas apresentaram perfis de dissolução semelhante. Entretanto, as cápsulas no meio que simula as condições gástricas (HCl 0,1M) obtiveram cinética de dissolução rápida, 90% do fármaco dissolveram nos primeiros 10 minutos do teste.

5.4 CONCLUSÕES

O método para determinação de naringina em formas farmacêuticas sólidas foi validado, permitindo a quantificação do fármaco em formas farmacêuticas sólidas. A técnica proposta demonstrou ter linearidade, precisão e exatidão, além de ser específica e robusta. Portanto, conclui-se que a metodologia analítica é aplicável nas análises de controle de qualidade e avaliação do teor de medicamentos contendo naringina.

Em relação à análise física e físico-química (peso médio, dureza, friabilidade, desintegração, teor, teste de dissolução e uniformidade de conteúdo) todos os lotes apresentaram de acordo com as especificações farmacopéicas.

No perfil de dissolução pode-se concluir que as cápsulas apresentaram maior porcentagem de cedência da naringina, nos três meios avaliados (água destilada, HCl 0,1M e tampão fosfato pH 6,8). Esse resultado sugere que essa forma farmacêutica seja a mais adequada para a administração oral da naringina, uma vez, que o fármaco estará mais disponível para a absorção e conseqüentemente terá maior biodisponibilidade.

Referências

1. AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. *A theoretical basic for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug productic dissolution and in vivo bioavailability*. **Pharm. Res.** 12(3): 413-420, 1995.
2. DRESSMAN, J.B.; AMIDON, G.L.; REPPAS, C.; SHAH, V.P. *Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms*. **Pharm. Res.** 15(1): 11-22, 1998.
3. MARQUES, M.R.C. *Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas orais*. **Revista Analytica.** 1: 48-51, 2002.
4. RAMA, A.C.R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I.V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. *Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina. Estudos de dissolução e coeficiente de partição*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** 42(1): 59-68, 2006.
5. SERRA, C.H.R.; STORPIRTIS, S. *Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de cinética e eficiência de dissolução (ED%)*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** 43(1): 79-88, 2007.
6. SOUZA, J.; FREITAS, Z.M.F.; STORPIRTIS, S. *Modelos in vitro para a determinação de fármacos e previsão da relação dissolução/ absorção*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** 43(4): 515-527, 2007.
7. STORPIRTIS, S. *Biofarmácia e farmacocinética: ensino e pesquisa*. **Infarma.** 2(4): 19-20, 1993.
8. UNITED States Pharmacopeia: USP 27: The National Formulary: NF 22. Rockville: United States.

6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICA DA NARINGINA

6.1 INTRODUÇÃO

Nos vegetais os flavonóides possuem as funções de proteção contra raios ultra-violeta, insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais polinizadores; ação antioxidante; controle de ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (ZUZANAZZI & MONTANA, 2004).

Plantas expostas a estresse hídrico severo protegem-se sintetizando antioxidantes como flavonóides, carotenóides, ascobarto, α -tocoferol e glutathione; e aumentando o teor de enzimas antioxidantes como peroxidases, superóxido dismutase e catalase (CARVALHO *et al.*, 2003).

Os radicais livres são espécies altamente reativas formadas endogenamente no organismo humano, que, apesar de possuírem sua função fisiológica, podem causar lesão celular. Eles surgem quando elétrons do último orbital de um átomo foram desemparelhados por ganho ou perda de um elétron. Essa transferência de elétrons ocorre nas reações de oxi-redução. O oxigênio molecular é a principal fonte de radicais livres na célula. Os principais alvos celulares de radicais livres são proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA. A produção excessiva de radicais livres pode conduzir a diversas formas de dano celular (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Os danos oxidativos irreversíveis causados por radicais livres estão associados ao desenvolvimento de doenças degenerativas, tais como: aterosclerose, doença de Parkinson, de Alzheimer, distúrbios cardiovasculares, câncer e diabetes (UCHÔA *et al.*, 2007). Na patogênese da DM tipo 1, causada por destruição auto imune das células β , o infiltrado inflamatório mediado por células T antígeno específicas leva à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), superóxidos, radical hidroxila (-OH) óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 e interferon. Interações sinérgicas entre ROS e essas citocinas levam à destruição das células β -pancreáticas. Isso ocorre porque células das ilhotas pancreáticas têm sensibilidade aumentada à ação das espécies reativas de oxigênio (PIGANELLI *et al.*, 2002).

As substâncias com atividade antioxidante protegem o organismo dos radicais livres e assim retardam ou previnem o processo de doenças ao inibirem o início ou a

propagação da reação de oxidação em cadeia (OLIVEIRA *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2007).

Os fármacos antioxidantes podem ser utilizados como auxiliares no tratamento de várias doenças. Além disso, o uso de produtos naturais como terapia medicamentosa tem uma perspectiva importante no desenvolvimento de novos fitoterápicos para o tratamento de doenças relacionadas com o estresse oxidativo, como por exemplo, a diabetes e a dislipidemia, e suas complicações (OLIVEIRA *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2007).

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos vegetais e substâncias isoladas, um dos mais usados consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila-DPPH, de coloração púrpura que absorve a 515 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R'), o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância.

Ao longo dos últimos anos, a ocorrência de infecções fúngicas humanas vem apresentando aumento expressivo (SILVA *et al.*, 2006). O tratamento das micoses humanas não é sempre efetivo, pois os fármacos antifúngicos disponíveis produzem recorrência ou causam resistência, além de apresentarem importante toxicidade. Por esta razão, há uma busca contínua de novos fármacos antifúngicos mais potentes, mas, sobretudo, mais seguros que os existentes (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Com freqüência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento e considerando a resistência das leveduras pertencente ao gênero *Candida* frente aos antifúngicos atualmente utilizados, torna-se importante à busca de novos compostos antifúngicos de origem vegetal que possam auxiliar a terapêutica (LIMA *et al.*, 2006).

O paciente com DM pode apresentar infecções mais freqüentes e mais severas quando comparados a indivíduos saudáveis. Na DM ocorre diminuição na quimiotaxia dos neutrófilos. O DM se associa ao maior risco de infecções urinárias, e *Candida sp.* É o principal gênero envolvido. Dentre as espécies desse gênero, *Candida albicans*, é a principal responsável pelas infecções fúngicas. Existem outras espécies inseridas

nesse gênero como *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* que também estão envolvidas na etiologia da candidíase.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Avaliação da atividade antioxidante

Foram utilizados solventes e reagentes de grau analítico. O radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), a naringina e naringenina foram adquiridos do Sigma Aldrich, a rutina da Fluka Biochemika e o butil-hidroxi-anisol (BHA) da Synth. As medidas da absorção foram feitas usando espectrofotômetro UV-Vis Micronal B562.

A avaliação qualitativa foi feita por cromatografia em camada delgada (CCD) usando BHA como padrão positivo de comparação. As placas foram eluídas com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5) e, após secagem, foram nebulizadas com solução a 0,4 mmol/L do radical DPPH em MeOH. As placas foram observadas até o aparecimento de manchas amarelas sob fundo de coloração púrpura, indicativo de possível atividade antioxidante.

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações. Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 516 nm, tendo como controle positivo a rutina e o BHA.

Para a construção da curva de calibração do DPPH, foram preparados 50 mL de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mantida sob refrigeração e protegida luz. Foram feitas diluições de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorbância a 516 nm de todas as soluções, medidas em cubeta de vidro com percurso óptico de 1 cm tendo como branco o metanol. As medidas de absorbância foram feitas em triplicata e em intervalos de 1 minuto entre cada medida.

Soluções dos flavonóides e do controle positivo em metanol foram diluídas nas concentrações 250, 300, 150, 100, 50 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As medidas das absorbâncias das

misturas reacionais (0,3mL de solução amostras ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH na concentração de 40 µg/mL) foram feitas a 516 nm, no 1º e a cada 10 minutos até completar 1 hora. A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorbância foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes.

6.2.2 Avaliação da atividade antifúngica

Os padrões de naringina e naringenina constituíram as amostras de análise. O mentol, a rutina, o lapachol e os antifúngicos cetoconazol (Janssen-Cilag) e fluconazol (Pfizer) os controles de referência.

As amostras foram solubilizadas em DMSO (Merck), na concentração de 1%, com exceção do fluconazol que foi diluído em água destilada. A partir dessas soluções foi feita à preparação de diluições seriadas das amostras em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma). Para o preparo do meio RPMI, adicionou-se 10,4 g do liofilizado, 34,4 g de ácido morfolinopropanosulfônico e 100 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 7,0 e o meio foi esterilizado por filtração, utilizando-se membrana de nitrocelulose de poro 0,22 µm. O meio foi mantido em frasco estéril sob refrigeração (2º-8º C).

As concentrações testadas correspondem às faixas intercalares entre 1 a 512 µg/mL para as amostras, rutina, lapachol e o mentol; 0,015 a 8 µg/mL para o cetoconazol e 0,125 a 64 µg/mL para fluconazol.

Foram utilizados os seguintes microrganismos: *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida tropicalis* ATCC 750, provenientes do Laboratório de Micologia – Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Ouro Preto. No crescimento e manutenção das culturas celulares foi utilizado meio Sabouraud-dextrose (Himedia).

As amostras das espécies de *Candida* sp. Foram cultivadas em tubos contendo meio sabouraud-dextrose sólido e incubadas a 28º C durante 24 horas. A massa de células foi obtida e recolhida com alça esterilizada e ressuspensa em tubos contendo 5 mL de solução salina 0,85% estéril. O inóculo foi preparado com cerca de 10⁶ unidades formadoras de colônia por mL, equivalente a escala de turvação 0,5 da escala de MacFarland.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada em microplacas com 96 poços. Em cada poço foram adicionados 100 µL da amostra teste e 100 µL do inóculo de cada espécie de *Candida* sp., totalizando volume final de 200 µL em cada poço. As placas foram incubadas a 28° C e as leituras foram realizadas após 48 horas. As CIMs foram obtidas por leitura visual e expressas em redução de crescimento, comparadas aos controles positivos.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação preliminar qualitativa dos flavonóides naringina e naringenina por CCD em sílica gel, revelada com solução metanólica a 0,4 mmol/L do radical DPPH, sugeriu a existência de atividade antioxidante, evidenciada nos cromatogramas pela presença de manchas amarelas sob fundo púrpuro, resultantes da redução do radical DPPH.

Os resultados da avaliação quantitativa da naringina, naringenina e dos controles, nas concentrações 250, 300, 150, 100, 50 e 25 µg/mL, determinada pelo ensaio do DPPH, estão apresentados na FIGURA 15, mostrando que os flavonóides rutina e naringina apresentaram atividade seqüestradora do radical DPPH, contudo a naringenina foi o menos reativo nas cinco concentrações.

O comportamento cinético da reação do DPPH com cada flavonóide e com os controles, na concentração 100 µg/mL é mostrado na FIGURA 16, através da curva dose resposta relativa ao decréscimo de porcentagem remanescente do DPPH em função do tempo (minutos). Observou-se que a rutina e o BHA apresentaram cinética rápida, atingindo praticamente o máximo de consumo de DPPH nos primeiros 10 minutos, a amostra de naringina demonstrou uma porcentagem de DPPH remanescente em torno de 80%, e a naringenina não mostrou aumento significativo do consumo de DPPH nem mesmo ao longo do tempo total de observação (60 minutos).

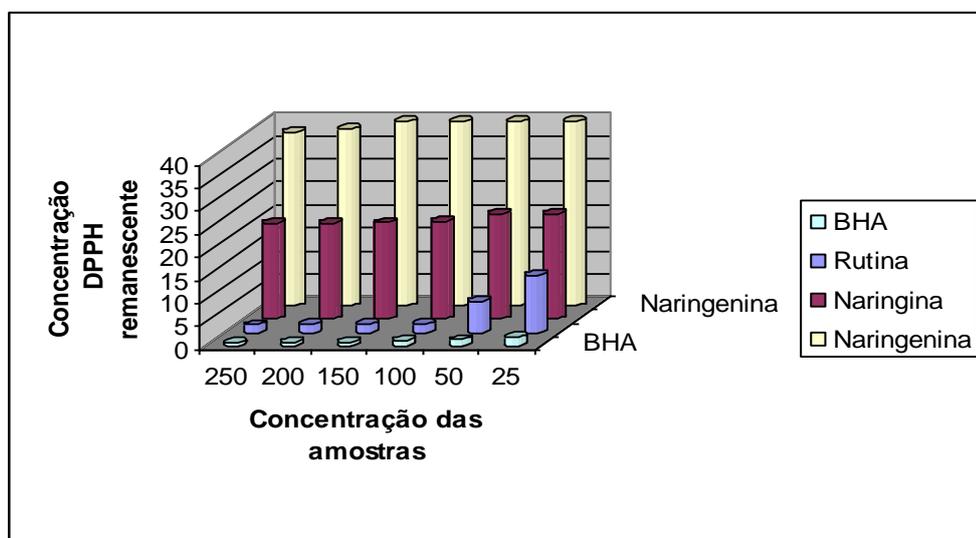


FIGURA 15: Concentração de DPPH remanescente nas amostras de rutina, naringenina, naringina e BHA no tempo de reação com DPPH 30 minutos.

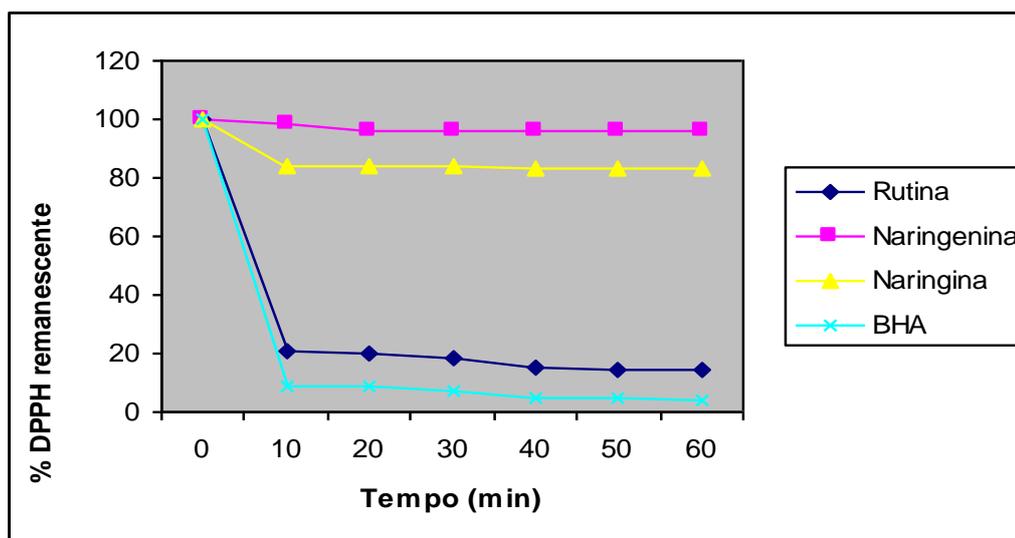


FIGURA 16: Comportamento cinético dos flavonóides rutina, naringina e naringenina na concentração 100 µg/mL frente ao DPPH.

Martinez *et al.* (2001) verificaram que em muitas frutas e vegetais, a atividade antioxidante de alguns flavonóides é mais importante que a atividade antioxidante da vitamina C, α -tocoferol e β -caroteno. Devido a esta propriedade, os flavonóides podem proteger as células das atividades dos compostos cancerígenos por estimular a atividade das enzimas detoxificadoras.

A naringina (NA), naringenina (NG), rutina (RU), lapachol (LP) e o mentol (MT) inibiram o crescimento fúngico conforme descrito na TABELA 11.

TABELA 11 Concentração inibitória mínima da naringina, naringenina, rutina, lapachol e mentol pelo método de microdiluição em placas contra *Candida* sp.

Microrganismo	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$)						
	NA	NG	RU	LP	MT	FLU*	CETO**
<i>C. albicans</i>	256	256	128	256	256	2	0,25
<i>C. krusei</i>	128	128	256	128	128	4	0,25
<i>C. parapsilosis</i>	256	256	256	256	256	2	0,25
<i>C. tropicalis</i>	256	256	128	256	256	64	8

*FLU – Fluconazol

**CETO - Cetoconazol

Os resultados demonstraram que a naringina e a naringenina apresentaram CIM de 128 $\mu\text{g/mL}$ para *Candida krusei*, a rutina apresentou essa mesma CIM para *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

O perfil de inibição de crescimento dos flavonóides analisados foi igual ao perfil de inibição do lapachol e do mentol, sendo a CIM de 256 $\mu\text{g/mL}$ para *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*; e 128 $\mu\text{g/mL}$ para *Candida krusei*.

Estudos realizados com a fração acetato de etila das folhas de *Pyrostegia venuta*, que contém flavonóides, entre eles, rutina e compostos fenólicos, inibiu o crescimento de *Candida albicans* na concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$ (SILVA *et al.*, 2007). O óleo essencial de menta promoveu inibição do crescimento dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*, nas concentrações de 1500 a 2000 mg/mL , respectivamente (PEREIRA *et al.*, 2006).

Os flavonóides avaliados se apresentaram como potenciais fármacos antifúngicos. Segundo ALIGIANIS *et al.* (2001), os materiais vegetais que possuem CIM de até 500 $\mu\text{g/mL}$ são considerados fármacos com forte inibição.

6.4 CONCLUSÕES

Considerando que substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra riscos de muitos processos patológicos, os resultados descritos neste

trabalho estimulam a continuidade dos estudos para avaliar a ação antioxidante dos flavonóides, especialmente a naringina.

Os flavonóides representam uma contribuição importante ao potencial antioxidante da dieta. Embora outras pesquisas sejam necessárias, principalmente acerca do mecanismo de ação, absorção, metabolização, excreção e toxicidade, os dados obtidos reforçam a importância dos flavonóides como antioxidantes, tanto em dietas e medicamentos, como em terapias de suplementação antioxidante.

As propriedades antioxidantes dos flavonóides podem ser benéficas à saúde, já que previnem a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade; uma vez oxidada, acredita-se que a LDL é aterogênica. Portanto, o bloqueio da oxidação da LDL, pode diminuir a formação de placas ateroscleróticas que reduzem a rigidez arterial, deixando as artérias mais susceptíveis aos estímulos endógenos de vasodilatação.

Em relação à avaliação antifúngica, os dados obtidos nesse estudo, demonstram o potencial antifúngico promissor da naringina e naringenina. Entretanto, estudos mais detalhados deverão ser realizados, especialmente estudos com a associação desses flavonóides com outros fármacos antifúngicos, em formulações tópicas e de uso oral.

Referências

1. ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. *Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two Oregano species*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 49: 4168-4170, 2001.
2. ALMEIDA, L.S.B.; MURATA, R.M.; YATSUDA, R.; SANTOS, M.H.; NAGEM, T.J.; ALENCAR, S.M.; KOO, H.; ROSALEN, P.L. *Antimicrobial activity of Rhaetia resiliencies and 7-epiclusianone against Streptococcus mutants*. **Phytomedicine**, 12:01-06, 2008.
3. ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A. *Determinação de conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de Acácia podalyriifolia A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17(2): 231-235, 2007.
4. BIANCHI, M.L.; ANTUNES, L.M.G. *Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta*. **Revista de Nutrição**, 12(2): 123-130, 1999.

5. CARVALHO, L.M.; CASALI, V.W.D.; SOUZA, M.A.; CECON, P.R. *Disponibilidade de água no solo e crescimento de artemísia*. **Horticultura Brasileira**, 21(4): 726-730, 2003.
6. LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUSA, E.L. *Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(2): 197-201, 2006.
7. MARTÍNEZ, A.; HAZA, A.I.; MORALES, P. *Frutas y verduras como agentes preventivos en la dieta*. **Alimentaria**, 319(1): 27-31, 2001.
8. OLIVEIRA, P.E.S.; SILVA, T.B.C.; SILVA, A.P.F.; CONSERVA, L.M. *Radical scavenging and antioxidant activities of phenolic compounds and extract from fruits of Triplaris Americana L.* In: **1ST Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]**; São Pedro, SP, 2007.
9. PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R.; COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.S.; FERNANDES, A.F.; FONSECA, E.W.N.; PICCOLI, R.H.; *Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos*. **Revista Agrotécnica**, 30(4): 731-738, 2006.
10. PIGANELLI, J.D.; FLORES, S.C.; CRUZ, C.; KOEPP, J.; BATINIC-HABERLE, I.; CRAPO, J.; KACHADOURIAN, R.; YOUNG, R.; BRADLEY, B.; HASKINS, K. *A metalloporphyrin-based superoxide dismutase mimic inhibits adoptive transfer of autoimmune diabetes by a diabetogenic T-cell clone*. **Diabetes**, 51: 347-355, 2002.
11. SILVA, L.; ONIKI, G.H.; AGRIPINO, D.G.; MORENO, P.R.H.; YOUNG, M.C.M.; MAYORM, M.A.S.; LADEIRA, A.M. *Biciclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica de extratos de folhas de Cissus verticillata (L.) Nicolson & Jarves (Vitaceae)*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17(3): 361-367, 2007.
12. SILVA, R.A.; RODRIGUES, A.E.; RIBEIRO, M.C.M.; CUSTÓDIO, A.R.; ANDRADE, N.E.D.; PEREIRA, W.E. *Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil*. **Ciência Rural**, 36(6): 1842-1848, 2006.
13. UCHÔA, V.T.; CARVALHO, A.A.; SOUSA, C.M.M.; CHAVES, M.H.; SANTANA, A.E.G. *Evaluation of the antioxidant activity of isolated Ximenia Americana L. extracts and compounds*. In: **1ST Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]**; São Pedro, SP, 2007.
14. ZUZANAZZI, J.A.S.; MONTANA, J.A. *Natural Flavonóides*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5^a ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/UFSC. Cap. 23, 577-614, 2004.

7 ESTUDO DA NARINGINA NO TRATAMENTO DA DIABETES

7.1 INTRODUÇÃO

7.1.1 Diabetes e Princípios Ativos Naturais

Doenças cardiovasculares coronarianas, dislipidemias, hipertensão, obesidade e diabetes formam um conjunto de morbidades geralmente associadas entre si, constituindo-se em graves problemas de saúde pública.

A DM é um estado patológico caracterizado por hiperglicemia crônica. A prevalência da diabetes está aumentando de forma exponencial, adquirindo características epidêmicas em vários países. Nas Américas, o número de indivíduos com diabetes foi estimado para 65 milhões em 2025. Nos países desenvolvidos, o aumento ocorrerá nas faixas etárias, principalmente no grupo de 45-64 anos, em que sua prevalência deverá triplicar, duplicando nas faixas etárias de 20-44 e 65 e mais anos (KING *et al.*, 1998).

A diabetes acomete, no Brasil, 10% da população adulta. Essa doença constitui um conjunto de desordens metabólicas resultantes da insuficiência de insulina ou de fatores que interferem na ação desse hormônio, que se inicia pela ligação aos receptores, constituídos de glicoproteínas, e localizados nas membranas plasmáticas das células. A insulina estimula o transporte de glicose para dentro dos tecidos muscular e adiposo, por promover a translocação de transportadores de glicose intracelular para a membrana. Os transportadores retornam para o interior celular após a liberação da insulina (QUINN *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2002a; DAVIS & GRANNER, 1996).

Milhares de pacientes com diabetes apresentam complicações micro e macrovasculares. As complicações microvasculares tendem a predominar na diabetes tipo-2, com a qual ocorrem lesões da microvasculatura. A nefropatia diabética é a causa principal de enfermidade renal em estado terminal, e com ela se desenvolve uma insuficiência renal crônica, que se agrava com o tempo. Entre os diabéticos há duas vezes mais probabilidade de acidente vascular cerebral e de enfermidade coronária cardíaca. Na ausência de insulina ou eficácia de sua ação, tem-se a atividade da lipase reduzida e, portanto, a lipólise é diminuída e as concentrações de triacilgliceróis, colesterol e fosfolípidos aumentam no sangue (OLIVEIRA *et al.*, 2002b).

Muitas espécies de plantas tem sido usadas etnofarmacologicamente ou experimentalmente para tratar os sintomas da DM. A maioria das plantas que são utilizadas como antidiabéticas demonstraram ter atividade hipoglicemiante. Dados etnobotânicos relatam que cerca de 800 plantas com potencial antidiabético tiveram resultados positivos em ensaios experimentais. Os constituintes químicos dessas plantas podem ser utilizados como modelos para novos fármacos hipoglicemiantes (NEGRI, 2005).

O mecanismo de ação pelos quais as plantas reduzem a taxa de glicose do sangue pode ser atribuído ao aumento da liberação de insulina por meio da estimulação das células β do pâncreas; à resistência aos hormônios que aumentam a taxa de glicose; ao aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina; à diminuição da perda de glicogênio; ao aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos; à eliminação de radicais livres; à resistência a peroxidação de lipídeos; à correção da desordem metabólica causada em lipídeos e proteínas; e ao estímulo ao aumento da microcirculação do sangue no organismo (NEGRI, 2005).

Células β -pancreáticas estão relacionadas à sensibilidade para estresse oxidativo, fator que pode contribuir ao mau funcionamento, característico das células produtoras de insulina, no diabetes. Diabetes induzida por aloxano e subsequente elevação de glicose no sangue foram modificados pela administração de polifenóis de chá-verde (*Camellia sinensis*). Nessas condições *in vivo*, GSH (glutathiona) agiu como antioxidante e observou-se a diminuição da DM. O aumento do conteúdo de GSH no fígado de ratos tratados com flavonóides atuaria como um dos fatores responsáveis pela inibição da peroxidação lipídica (SABU *et al.*, 2002).

Segundo Kamalakkannan & Prince (2006), ratos com diabetes induzido por estreptozotocina, tratados com rutina em doses diferentes, tiveram redução nas concentrações séricas de glicose, além de aumentar os níveis de insulina, de peptídeo-C e proteger os animais com diabetes induzido da peroxidação lipídica. Ratos diabéticos tratados com rutina 100 mg/kg tiveram níveis de hemoglobina glicosilada diminuída, aumento das proteínas totais, aumento dos níveis de antioxidantes não enzimáticos (GSH, vitamina C, vitamina E e Ceruloplasmina).

7.1.2 Principais Aspectos dos Animais Utilizados no Experimento

Os coelhos apresentam estômago e ceco bastante desenvolvidos, adaptados a digestão de forragens e cereais. Um coelho adulto alimenta-se 20 a 40 vezes ao dia, ingerindo cerca de 1,08 g de alimento por minuto. Em comparação com outros herbívoros não ruminantes, o coelho é pouco eficiente na digestão de fibras. Os processos digestivos iniciam-se no momento da ingestão dos alimentos. Os carboidratos são absorvidos na forma de açúcares e as enzimas digestivas são secretadas pelo pâncreas, intestino delgado e mucosa intestinal (LEBAS, 1985; CHEEKE, 1995).

Os coelhos podem aproveitar com maior eficiência os alimentos por meio da coprofagia, ingerindo parte do material fecal, chamados de fezes moles, ou cecotrofos, que são produzidos a partir da fermentação cecal (NOGUEIRA, 1989).

Os modelos mais utilizados para avaliação *in vivo* da atividade antidiabética são animais tratados com aloxano ou estreptozotocina. O aloxano é um agente diabetogênico seletivo na destruição das células β pancreáticas. É um composto hidrofílico derivado da pirimidina. O mecanismo de ação citotóxica ocorre através da produção de espécies reativas de oxigênio e aumento na concentração de cálcio citosólico (NEGRI, 2005; ELSNER *et al.*, 2002; SZKUDELSKI, 2001).

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Cápsulas e comprimidos

Para administração aos animais durante o experimento, utilizaram-se comprimidos e cápsulas de naringina desenvolvidos no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Ouro Preto. Foram produzidos três lotes de cada forma farmacêutica contendo, respectivamente, as seguintes doses: 5 mg (equivalente a 2,5 mg/kg), 10 mg (5 mg/kg) e 25 mg (12,5 mg/kg).

7.2.2 Animais

Foram utilizados 54 coelhos da raça Nova Zelândia, albinos, com idade média de 55 dias, pesando em média 2,0 kg, provenientes do Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os animais foram mantidos em área experimental no Laboratório Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. Eles foram acondicionados em gaiolas individuais, com temperatura controlada na faixa entre 22^o-24^o C e fotoperíodo de 12 horas.

7.2.3 Período de Adaptação

Durante os primeiros cinco dias, os animais ficaram em processo de adaptação na área experimental. O regime alimentar constituiu-se de 120 g de ração comercial (Soma Alimentos[®]) e água *ad libitum*.

7.2.4 Indução da Diabetes

Após o período de adaptação foi feita a indução da diabetes em 48 animais. A indução foi realizada através da administração intravenosa de aloxano (Sigma Aldrich[®]) 100 mg/kg. Para a aplicação, o animal foi imobilizado em uma guilhotina de madeira. A administração foi feita na veia marginal de uma das orelhas do coelho. O volume administrado foi calculado de acordo com o peso de cada animal.

A solução de aloxano foi preparada dissolvendo o fármaco em tampão citrato até obter uma concentração de 100 mg/mL. Para a completa dissolução, a solução preparada foi colocada em banho-maria a 37^o C.

Uma hora após a administração do aloxano, os animais foram alimentados com 120 g de ração comercial. Após três horas de aplicação do aloxano, foram administrados por via intraperitoneal, 10 mL de solução de glicose 50%. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes a cada quatro horas, com o objetivo de evitar a hipoglicemia, que surge após as primeiras horas da aplicação do aloxano. A hipoglicemia ocorre porque, de acordo com BONDY (1969), as células β pancreáticas destruídas pelo aloxano lançam,

inicialmente, grande quantidade de insulina no sangue. Após o consumo dessa insulina, o nível de glicose volta a subir e ultrapassar o normal. Em seguida, os animais permaneceram por 7 dias em observação, sendo alimentados com 120 g/dia de ração comercial.

Aos animais do grupo normal foi administrado por via intravenosa solução salina (NaCl 0,9%), a fim de se promover o mesmo estresse dos outros animais.

Para a verificação da indução de hiperglicemia, sete dias após a administração do aloxano, realizou-se a dosagem de glicose no sangue, após jejum de 12 horas. Os animais que apresentaram glicemia superior a 180 mg/dL foram separados aleatoriamente entre os grupos diabéticos.

7.2.5 Grupos Experimentais

Os animais foram separados aleatoriamente, em grupos de 6 animais, conforme descrito na TABELA 12.

TABELA 12 Constituição dos grupos experimentais - Diabetes

Grupos (n=6)	Característica dos animais
G1	Diabético não tratado
G2	Normal
G3	Diabético tratado com NA cápsula 5 mg
G4	Diabético tratado com NA cápsula 10 mg
G5	Diabético tratado com NA cápsula 25 mg
G6	Diabético tratado com NA comprimidos 5 mg
G7	Diabético tratado com NA comprimidos 10 mg
G8	Diabético tratado com NA comprimidos 25 mg
G9	Diabético tratado com Glibenclamida 5 mg

NA: Naringina

7.2.6 Tratamentos

Os animais foram tratados por um período de 28 dias de acordo com o grupo experimental. Trinta minutos após a administração do medicamento foi fornecido 120 g de ração a cada animal. O fornecimento de água durante todo o período foi *ad libitum*.

7.2.7 Dosagens de Parâmetros Sanguíneos

Os parâmetros sanguíneos colesterol total; HDL, triacilgliceróis; glicose; TGO; TGP; Gama GT; creatinina; uréia, ácido úrico, proteínas totais e albumina foram dosados utilizando Kits Bioclin – Quibasa e equipamento multiparamétrico – Alizé.

A coleta de sangue foi realizada após 28 dias de tratamento. O sangue foi coletado pela veia marginal da orelha. Logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas em Centrífuga Fanem® (Modelo 206-BL) a 2000 rpm de velocidade por 15 minutos. Para a dosagem de glicose no plasma foi utilizado tubo de ensaio contendo fluoreto, que inibe as enzimas da via glicolítica, inibindo o consumo de glicose após a coleta. As demais dosagens bioquímicas foram realizadas em plasma heparinizado.

7.2.8 Eutanásia

No fim do experimento os animais foram eutanasiados utilizando-se os anestésicos Xilazina (5 mg/kg) e Cetamina (20 mg/kg) por via muscular e posteriormente realizou-se a exanguinação (punção cardíaca).

7.2.9 Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com nove tratamentos e seis repetições. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A TABELA 13 e a FIGURA 17 apresentam os valores médios de glicose em mg/dL dos animais em relação ao grupo diabético controle (doente não tratado).

TABELA Valores médios de glicose no plasma de coelhos após 28 dias de tratamento com naringina.

Grupo	Glicose (mg/dL)	
	Média	% var.
G1 Diabético não tratado	357,22 A	0,00
G2 Normal	131,40 B	-63,22
G3 Diabético tratado com NA cápsula 5 mg	171,20 B	-52,07
G4 Diabético tratado com NA cápsula 10 mg	133,36 B	-62,66
G5 Diabético tratado com NA cápsula 25 mg	151,30 B	-57,64
G6 Diabético tratado com NA comp. 5 mg	153,90 B	-56,93
G7 Diabético tratado com NA comp. 10 mg	318,50 A	-10,34
G8 Diabético tratado com NA comp. 25 mg	271,60 B	-23,97
G9 Diabético tratado com Glibenclamida 5 mg	115,90 B	-67,57

Teste Dunnett a 5% de significância.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett.

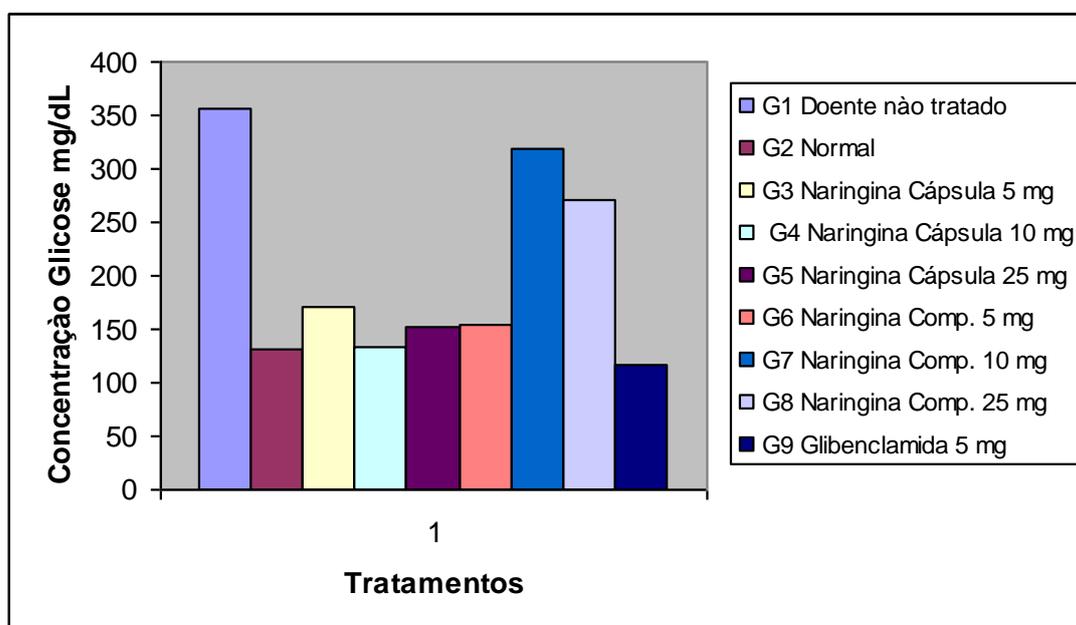


FIGURA 17 Médias de glicose por grupo após 28 dias de tratamento

Aos 28 dias de tratamento observou-se que todos os grupos tratados com naringina apresentaram redução na concentração plasmática de glicose. Os grupos G4, tratado com cápsulas de naringina 10 mg (5 mg/kg), e o G5, tratado com cápsulas de naringina 25 mg (12,5 mg/kg), demonstraram redução de 62,66% e 57,64%, respectivamente, nas concentrações plasmáticas de glicose. Se considerado o significado clínico dessas variações, esses grupos foram os mais eficazes nas reduções dos níveis de glicose. Em relação aos comprimidos, o grupo G6, dose 5 mg (2,5 mg/kg), apresentou 53,96% de redução de glicose plasmática. A glibenclâmida, fármaco hipoglicemiante disponível comercialmente, teve redução de 67,57%. Todos os grupos apresentaram variações que foram estatisticamente significativas, com exceção do grupo G7.

Muitos pesquisadores têm buscado mecanismos para explicar a ação hipoglicemiante dos flavonóides. Ong *et al.* (2000), pesquisando os efeitos da miricetina na glicemia e no metabolismo de glicogênio em ratos diabéticos, verificaram que, na dose 3 mg/kg de peso, esse fármaco foi capaz de estimular o transporte de glicose em adipócitos de ratos e também acentuar a lipogênese estimulada por insulina. Além disso, a glicemia foi reduzida em 50%.

Zarzuelo *et al.* (1996) observaram os efeitos da 5-O-rutinosil luteolina sobre a diabetes em ratos. A administração desse flavonóide por 20 dias na concentração de 2 mg/kg reduziu significativamente os níveis de glicose em 51% e aumentou os níveis de insulina em 2,5 vezes, sugerindo que os flavonóides atuariam estimulando a liberação de insulina pelo pâncreas.

Os extratos brutos das folhas de *Brickellia veronicaefolia* produziram efeito hipoglicemiante em ratos diabéticos induzidos por aloxano, e a partir do extrato foi isolada a 5,7,3'-triidroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona, a qual produziu um efeito hipoglicêmico significativo, porém menos efetivo do que a tolbutamida (PEREZ *et al.*, 2000). Os flavonóides encontrados no extrato aquoso de *Ajuga iva* apresentaram atividade hipoglicemiante (HILALY & LYOUSSI, 2002), assim como os flavonóides rutina e isoquercetina encontrados no extrato aquoso de *Phyllanthus sellowianus* (HNATYSZYN *et al.*, 2002).

Os esteróides e os flavonóides encontrados no extrato metanólico das sementes de *Punica granatum* também apresentaram atividade hipoglicemiante (DAS *et al.*, 2001).

Três derivados de kaempferol glicosilados isolados do extrato aquoso e butanólico das partes aéreas de *Equisetum myriochaetum* exerceram atividade hipoglicemiante em ratos que tiveram diabetes induzida por estreptozotocina (ANDRADE-CETTO & WIEDENFELD, 2001).

Um dos mecanismos de ação dos flavonóides mostra que eles se ligam a receptores de insulina. A insulina, hormônio com papel central na regulação da glicemia, atua de maneira coordenada no metabolismo lipídico e protéico. Age nas células através de seu receptor transmembrana que tem uma atividade tiroquinase. Em culturas de células animais, a ativação do receptor de insulina leva a uma subsequente fosforilação dos resíduos de tirosina de uma proteína citoplasmática. A atividade tirosinaquinase é fundamental para os efeitos biológicos finais da insulina. As flavanonas têm capacidade de aumentar a atividade dessas enzimas. Os resultados sugerem que os flavonóides potencializam a atividade de tiroquinase dos receptores de insulina (AGULLO *et al.*, 1997).

Pesquisadores também demonstraram que flavonóides participam das etapas iniciais da ação de insulina no fígado e músculo de ratos, efeito que se relaciona com metabolismo lipídico, visto que alguns hormônios específicos atuam em sincronia e sintonia com as células, interferindo sobre a síntese de enzimas, ativação de lipase, inibição da lipoxigenase, ciclooxigenase e especificidade de enzimas (OLIVEIRA *et al.*, 2002b).

Levando-se em consideração que o aloxano destrói as células β do pâncreas, que produzem insulina, vários efeitos podem ser desencadeados a partir daí. O transporte de glicose ao interior das células depende da presença de insulina anexa aos locais receptores nas membranas celulares. Na deficiência de insulina, a glicose não pode atravessar a membrana da célula, acumulando-se no sangue, o que leva a hiperglicemia e glicosúria. Exceções são o cérebro, fígado, cristalino dos olhos, hemácias e medula renal, nos quais a glicose está apta a difundir-se através da membrana celular sem intervenção de insulina.

Os resultados dos valores médios de triacilgliceróis estão apresentados na TABELA 14. Observou-se que houve aumento na concentração plasmática de triacilgliceróis em alguns grupos doentes (G3, G5, G6, G7 e G9), incluindo o grupo tratado

com glibenclamida. Esse aumento ocorre porque, em diabéticos, há redução da atividade da enzima lipase, responsável pela hidrólise dos triacilgliceróis. O grupo tratado com cápsulas de naringina na concentração 5 mg/kg de peso, apresentou redução de 29,39% nos valores de triacilgliceróis plasmáticos. O grupo tratado com glibenclamida apresentou elevação de 117,11% nas concentrações de triacilgliceróis. Entretanto, apenas os grupos G3 e G9 foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$), em relação ao grupo doente não tratado. Esse resultado clínico dos tratamentos com naringina é favorável a pacientes diabéticos e hipertrigliceridêmicos.

TABELA 14 Valores médios de triacilgliceróis no plasma de coelhos após 28 dias de tratamento com naringina.

Grupo	Triacilgliceróis (mg/dL)	
	Média	% var.
G1 Diabético não tratado	104,41 A	0,00
G2 Normal	146,00 A	-86,02
G3 Diabético tratado com NA cápsula 5 mg	198,34 B	89,86
G4 Diabético tratado com NA cápsula 10 mg	73,72 A	-29,39
G5 Diabético tratado com NA cápsula 25 mg	119,20 A	14,19
G6 Diabético tratado com NA comp. 5 mg	111,10 A	6,36
G7 Diabético tratado com NA comp. 10 mg	127,90 A	22,51
G8 Diabético tratado com NA comp. 25 mg	102,30 A	-2,06
G9 Diabético tratado com Glibenclamida 5 mg	227,40 B	117,77

Teste Dunnett a 5% de significância.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett.

De acordo com os resultados demonstrados na TABELA 15 houve redução nos valores de colesterol total em todos os grupos tratados com naringina, exceto no grupo G7 e no grupo tratado com hipoglicemiante de uso oral, onde houve aumento. As variações não foram estatisticamente significativas para os grupos G3, G4, G5 e G6. Entretanto, todos os grupos apresentaram concentrações plasmáticas de colesterol dentro da normalidade.

TABELA 15 Valores médios de colesterol-HDL e colesterol total em plasma de coelhos diabéticos após 28 dias de tratamento com naringina.

Tratamentos	HDL-colesterol (mg/dL)		colesterol total (mg/dL)	
	Conteúdo	% Variação	Conteúdo	% Variação
G1 Diabético não tratado	15,83 A	0,00	70,24 A	0,00
G2 Normal	39,70 B	150,79	66,70 A	-5,04
G3 Diabético tratado com NA cápsula 5 mg	14,74 A	-6,89	39,18 B	-44,22
G4 Diabético tratado com NA cápsula 10 mg	21,62 A	36,58	39,93 B	-43,15
G5 Diabético tratado com NA cápsula 25 mg	17,40 A	9,67	44,60 B	-36,57
G6 Diabético tratado com NA comprimido 5 mg	15,80 A	0,06	42,30 B	-39,76
G7 Diabético tratado com NA comprimido 10 mg	29,70 B	87,81	90,30 B	28,60
G8 Diabético tratado com NA comprimido 25 mg	27,80 B	75,36	64,80 A	-7,73
G9 Diabético tratado com Glibenclamida 5 mg	25,20 B	59,07	80,40 A	14,39

Teste Dunnett a 5% de significância.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett.

Em relação ao HLD-colesterol, o tratamento com comprimidos de naringina na dose 5 mg/kg de peso foi capaz de aumentar os níveis de HDL em 87,81%. Resultado este satisfatório, uma vez que concentrações elevadas de HDL contribuem para o metabolismo das frações LDL e VLDL do colesterol. Com exceção dos grupos G8 e G9, todas as variações foram estatisticamente significativas em relação ao doente controle.

TABELA 16 Valores médios de creatinina e uréia no plasma de coelhos após 28 dias de tratamento com naringina.

Grupo	Creatinina (mg/dL)		Uréia (mg/dL)	
	Média	% var.	Média	% var.
G1 Diabético não tratado	1,27 A	0,00	34,08 A	0,00
G2 Normal	1,60 B	25,98	16,60 B	51,23
G3 Diabético tratado com NA caps. 5 mg	1,24 A	-2,36	26,80 A	21,36
G4 Diabético tratado com NA caps. 10 mg	1,43 A	12,60	23,44 B	31,22
G5 Diabético tratado com NA caps. 25 mg	1,40 A	6,30	31,10 A	-8,89
G6 Diabético tratado com NA comp. 5 mg	1,40 A	6,36	24,40 A	28,29
G7 Diabético tratado com NA comp. 10 mg	1,41 A	8,66	33,40 A	-1,88
G8 Diabético tratado com NA comp. 25 mg	1,50 A	21,26	42,80 A	25,59
G9 Diabético tratado com Glibenclamida 5 mg	1,70 B	30,71	32,50 A	-4,55

Teste Dunnett a 5% de significância.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett.

Os níveis plasmáticos de creatinina (TABELA 16) não sofreram alterações significativas com os tratamentos de naringina nas diversas doses testadas, em relação ao grupo doente não tratado. De acordo com os resultados, os níveis de uréia se apresentaram reduzidos em três grupos. Em pacientes com complicações diabéticas e em glomerulonefrites a uréia pode ser elevada. Este parâmetro nos mamíferos é o principal produto final do metabolismo protéico. Os coelhos são herbívoros, porém utilizam a uréia para a síntese protéica. O aumento do teor de uréia no sangue pode ser devido à redução da eliminação renal, aumento do catabolismo protéico e combinação destes dois mecanismos. A taxa de uréia se acha reduzida na insuficiência hepática aguda e necrose hepática.

Os resultados de aspartato aminotransferase (AST) listados na TABELA 17 demonstraram que aos 28 dias os grupos G7, G8 e G9 apresentaram aumentos superiores a 100%. Esses resultados foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$)

quando comparados ao grupo doente não tratado e grupo normal. Os teores mais elevados de AST ocorrem na necrose hepática, hepatite virótica e no infarto do miocárdio. Na DM há aumento nos níveis de AST, que também aumenta na anemia hemolítica aguda, necrose renal e queimaduras graves. Os resultados referentes ao parâmetro sanguíneo alanina aminotransferase (ALT) demonstraram que todos os animais tratados com cápsulas de naringina e com os comprimidos na dose 5 mg/kg apresentaram redução nos valores ALT. Os demais grupos tratados com comprimidos apresentaram elevação nas concentrações plasmáticas em relação ao grupo doente não tratado. Entretanto, apenas o grupo G8, apresentou valores estatisticamente significativos em relação ao grupo doente não tratado.

TABELA 17 Valores médios de TGO (AST) e TGP (ALT) no plasma de coelhos após 28 dias de tratamento com naringina.

Grupo	TGO (UI)		TGP (UI)	
	Média	% var.	Média	% var.
G1 Diabético não tratado	179,25 A	0,00	181,03 A	0,00
G2 Normal	60,30 A	-66,36	158,30 A	-12,56
G3 Diabético tratado com NA caps. 5 mg	150,00 A	-16,32	129,03 A	-28,72
G4 Diabético tratado com NA caps. 10 mg	311,02 A	73,51	166,48 A	-8,04
G5 Diabético tratado com NA caps. 25 mg	226,40 A	26,32	169,50 A	-6,36
G6 Diabético tratado com NA comp. 5 mg	67,10 A	-62,58	177,00 A	-2,22
G7 Diabético tratado com NA comp. 10 mg	500,80 B	179,36	233,20 A	28,84
G8 Diabético tratado com NA comp. 25 mg	405,30 B	126,12	234,20 B	29,38
G9 Diabético tratado com Glibenclamida 5 mg	390,60 B	117,90	160,30 A	-11,46

Teste Dunnett a 5% de significância.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett.

Segundo VIANA *et al.* (2004) níveis elevados de transaminases séricas ocorrem em animais diabéticos induzidos por aloxano ou streptozotocina. Alterações nas AST e ALT e na fosfatase alcalina caracterizam alterações hepáticas. Elevação na atividade dessas enzimas ocorre com maior freqüência em pacientes diabéticos e estão associadas a complicações como neuropatia e retinopatia.

TABELA 18 Valores médios de gama-GT e ácido úrico no plasma de coelhos após 28 dias de tratamento com naringina.

Grupo	Gama-GT (UI)		Ácido úrico (mg/dL)	
	Média	% var.	Média	% var.
G1 Diabético não tratado	20,58 A	0,00	0,40 A	0,00
G2 Normal	17,00 A	-17,40	0,27 A	-32,50
G3 Diabético tratado com NA caps. 5 mg	13,20 A	-35,86	0,30 A	-25,00
G4 Diabético tratado com NA caps. 10 mg	22,48 A	9,23	0,46 A	15,40
G5 Diabético tratado com NA caps. 25 mg	18,20 A	-11,52	0,43 A	8,25
G6 Diabético tratado com NA comp. 5 mg	12,80 A	-37,76	0,60 A	51,50
G7 Diabético tratado com NA comp. 10 mg	58,20 B	182,94	1,40 B	251,00
G8 Diabético tratado com NA comp. 25 mg	32,80 A	59,28	1,64 B	310,00
G9 Diabético tratado com Glibenclamida 5 mg	10,30 A	-49,81	0,36 A	-9,25

Teste Dunnett a 5% de significância.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett.

Observou-se que aos 28 dias de tratamento houve aumento de 182,99% no G7, de 59,28% no G8 e de 9,23% no G4 para valores de gama-GT (TABELA 18). Nos demais tratamentos houve redução nas concentrações plasmáticas desse parâmetro. Entretanto, apenas o grupo G7 apresentou variação estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Observou-se aumento nas concentrações plasmáticas de ácido úrico nos tratamentos com naringina, com exceção do grupo na qual foi administrado cápsulas na dose 2,5 mg/kg de peso. Apenas os grupos tratados com comprimidos de naringina nas doses 10 mg e 25 mg apresentaram variações estatisticamente significativas, em relação ao grupo doente não tratado.

Estudos realizados com flavonóides nas doses de 20, 40, 60 mg administradas a coelhos por 28 dias, não causaram alterações renais consideradas prejudiciais, pois ocorreram pequenas variações nas concentrações de uréia e ácido úrico. O aumento da uricemia pode ocorrer por redução da excreção renal ou pelo excesso de produção (LOPES *et al.*, 2005).

TABELA 19 Valores médios de proteínas totais e albumina no plasma de coelhos após 28 dias de tratamento com naringina.

Grupo	Proteínas Totais (mg/dL)		Albumina (mg/dL)	
	Média	% var.	Média	% var.
G1 Diabético não tratado	49,70 A	0,00	3,43 A	0,00
G2 Normal	55,00 A	10,66	4,50 B	31,20
G3 Diabético tratado com NA caps. 5 mg	46,60 A	-8,25	3,37 A	-1,76
G4 Diabético tratado com NA caps. 10 mg	53,44 A	7,53	3,63 A	5,83
G5 Diabético tratado com NA caps. 25 mg	61,76 A	24,28	3,60 A	6,12
G6 Diabético tratado com NA comp. 5 mg	51,17 A	2,96	3,60 A	4,08
G7 Diabético tratado com NA comp. 10 mg	53,03 A	6,70	3,70 A	9,04
G8 Diabético tratado com NA comp. 25 mg	63,33 B	27,42	3,50 A	2,62
G9 Diabético tratado com Glibenclamida 5 mg	61,60 A	23,94	3,30 A	-4,96

Teste Dunnett a 5% de significância.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett.

De acordo com os resultados obtidos (TABELA 19) os tratamentos com as maiores doses de naringina aumentaram as concentrações plasmáticas de proteínas totais e albumina. Mas apenas o G8 (comprimido com a maior dose) foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$) em relação ao grupo G1.

Estudos indicam a não-toxicidade de flavonóides em relação aos níveis de proteínas plasmáticas. Ao avaliar os efeitos toxicológicos de alguns flavonóides (dentre eles a quercetina) no nível de proteína total de coelhos saudáveis, verificou que tais substâncias não provocaram alterações consideráveis no metabolismo protéico desses animais (RIBEIRO *et al.*, 2006).

A albumina é uma proteína cuja síntese ocorre no fígado e suas funções biológicas são ligação e transporte de inúmeras substâncias como aminoácidos, hormônios, ácidos graxos, bilirrubina, enzimas e metabólitos. Ela desempenha importante papel na manutenção da pressão osmótica devido ao seu peso molecular relativamente baixo. O fígado produz 12 g de albumina/dia, representando 25% do total de proteínas sintetizadas pelo fígado e metade das proteínas secretadas (RIBEIRO *et al.*, 2006).

A naringina apresentou resultados satisfatórios em relação às concentrações de proteínas plasmáticas (TABELA 19), pois a patogênese de doenças vasculares na DM envolve alterações no mecanismo homeostático, como alterações na função plaquetária, na função celular endotelial e no balanço homeostático, particularmente das proteínas plasmáticas envolvidas na coagulação.

7.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que os tratamentos com naringina reduziram clinicamente as concentrações plasmáticas de glicose nos animais com diabetes induzida por aloxano. A maior percentagem de redução foi obtida com a forma farmacêutica cápsula na concentração 5 mg/kg de peso.

Além da ação hipoglicemiante, pôde-se observar que a naringina aumentou as concentrações de colesterol-HDL e reduziu o colesterol total e os níveis de triacilgliceróis. Os resultados apresentados são promissores, pois a naringina se apresenta como uma nova alternativa terapêutica para pacientes diabéticos e que apresentam níveis elevados de colesterol plasmático.

Referências

1. AGULLO, G.; GAMET-PAYRASTRE, L.; MANET, S.; VIALA, C.; REMESY, C.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. *Relationship between flavonoids structure and inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase: A comparison with tyrosine kinase and protein kinase on inhibition.* **Biochem. Pharmacol.** 53:1649-1657, 1997.
2. ANDRADE-CETTO, A.; WIENDENFELD, H. *Hypoglycemic effect of Cecropia obtusifolia on streptozotocin diabetic rats.* **Journal Ethnopharmacology**, 78: 145-149, 2001.
3. CHEKKE, P.R. *Alimentación e nutrición del conejo.* Zaragoza (España), Acribia S.A., 429p., 1995.
4. DAS, A.K.; MANDAL, S.C.; BANERJEE, S.K.; SINHA, S.; SAHA, B.P.; PAL, M. *Study on the hypoglycaemic activity of Punica granatum seed in streptozotocin induced diabetic rats.* **Phytotherapy Research**, 15: 628-629, 2001.
5. DAVIS, S.N.; GRANNER, D.K. Insulina fármacos hipoglicemiantes orais e a farmacologia do pâncreas endócrino. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIARD, L.E. *As bases farmacológicas da terapêutica.* Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 1996.

6. ELSNER, M.; TIEDGE, M.; GULDBAKKE, B.; MUNDAY, R.; LENZEN, S. *Importance of the GLUT-2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxano.* **Diabetologia**, 45: 1542-1549, 2002.
7. HILALY, J.E.; LYOUSSI, B. *Hypoglycemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats.* **Journal Ethnopharmacology**, 80: 109-113, 2002.
8. HNATYSZYN, O.; MIÑO, T.; FERRARO, G.; ACEVEDO, C. *The hypoglycemic effect of *Phyllanthus sellowianus* fractions in streptozotocin-induced diabetic mice.* **Phytomedicine**, 09:556-559, 2002.
9. KAMALAKKANNAN, N.; PRINCE, P.S. *Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavanoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats.* **Basic Clinical Pharmacology Toxicol.** 98(1): 97-103, 2006.
10. KING, H.; AUBERT, R.E.; HERMAN, W.H. *Global burden of diabetes.* **Diabetes Care**, 21: 1414-1431, 1998.
11. LEBAS, F. *Alimentación de los Conejos.* In: Alimentación de los animales monogástricos. 1ª ed. Madri: Mundi-Prensa, p. 95-101, 1985.
12. LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; LIMA, L. R. P.; LEÃO, M. A.; LIMA, E. Q. *Efeito de diferentes doses de rutina sobre as concentrações de albumina, creatinina, uréia e ácido úrico no soro de coelhos.* **Revista Brasileira de Farmácia**, 86(1): 35-38, 2005.
13. NEGRI, G. *Diabetes mellitus: plantas e princípios ativos hipoglicemiantes.* **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 41(2):121-142, 2005.
14. NOGUEIRA, R.A. *Coprofagia em coelhos.* **Informe Agropecuário**, 159: 14-15, 1989.
15. OLIVEIRA, T.T.; LIBERATO. S.C.; NAGEM, T.J.; PINTO. A.S.; MAGALHÃES, N.M.; LIMA, E.Q.; BRUNORO, N.M.C.; BRESSAN, J.; COSTA, M.R.; SILVA, R.R.; LEÃO, M.A. *Efeito de naringina e fruta-de-lobo no diabetes.* **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 34(3): 161-165, 2002a.
16. OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; MESSAGE, D.; ARAÚJO, A.L.; MAGALHÃES, N.M.; SILVA, J.F.; HUERTAS, A.A.G.; PINTO, J.G.; PEZERICO, G.B.; TSIOMIS, A.C. *Efeito de antocianina e própolis em diabetes induzida em coelhos.* **Revista Medicina**, 35: 464-469, 2002b.
17. ONG, K.C.; KHOO, H.E. *Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats.* **Life Science**, 67: 1675-1705, 2000.
18. PEREZ GUTIÉRREZ, R. M.; CERVANTES, C. H.; ZAVALA, S. M. A.; SANCHEZ, A. J.; PEREZ, G. S.; PEREZ, G. C. *Isolation and hypoglycemic activity of 5, 7, 3'-tryhydroxy-3,6,4'-trimetoxiflavona from *Brickellia veronicaefolia*.* **Phytomedicine**, 07: 25-29, 2000.

19. QUINN, C.C.; GRUBER-BALDINI, A.L.; SHARDELL, S.; WEED, K.; CLOUGH, S.S.; PEEPLES, M.; TERRIN, M.; BRONICH-HALL, L.; BARR, E.; LENDER, D. *Mobile diabetes intervention study: testing a personalized treatment/ behavioral communication intervention for blood glucose control*. **Contemporary Clinical Trials**, 30: 334-345, 2009.
20. RIBEIRO, J. N.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; FERREIRA JÚNIOR, D. B.; PINTO, A. S. *Avaliação dos parâmetros sanguíneos de hepatotoxicidade em coelhos normais submetidos a tratamentos com antocianina e antocianina + naringenina*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 38(1): 23-27, 2006.
21. SABU, M.C.; SMITHA, K.; KUTTAN, R. *Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes*. **Journal Ethnopharmacology**, 83(1-2): 109-116, 2002.
22. SKUDELSKI, T. *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas*. **Physiology Research**, 50: 536-546, 2001.
23. VIANA, G. S. B.; MEDEIROS, A. C.; LACERDA, A. M. R.; LEAL, L. K. A. M.; VALE, T. G.; MATOS, F. J. A. *Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides**. **BMC Pharmacology**, 04:9-15, 2004.
24. ZARZUELO, I.; JIMENES, M.J.; GÁMEZ, P.; UTRILLA, I.; FERNÁNDEZ, M.I.; TORRES, I. *Effect of 5-O-rutinoside in streptozotocin induced diabetic rats*. **Life Sciences**, 25: 2311-22316, 1996.

8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPOCOLESTEROLEMIANTE DA NARINGINA

8.1 INTRODUÇÃO

Existe um delicado equilíbrio no organismo para cobrir as necessidades de lipídios das células e ao mesmo tempo, evitar seu acúmulo excessivo. Por evidências não muito claras, esse equilíbrio pode romper-se, elevando o nível de um ou mais componentes lipídicos na corrente sanguínea, ao que se denomina dislipidemia. As alterações fisiopatológicas envolvidas na sua gênese promovem o acúmulo de LDL e VLDL nos compartimentos plasmáticos, resultando em hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (GONÇALVES *et al.*, 2006).

A doença cardiovascular é a principal causa de morbidade e mortalidade no Brasil e no mundo, sendo a aterosclerose um dos mais importantes fatores de risco. Está bem demonstrado que os níveis de colesterol total e suas frações de lipoproteínas exibem estreita correlação com incidência de eventos cardiovasculares (CHATTAS & PIMENTA, 2007).

Estudos de intervenção têm mostrado que o risco para doença arterial coronariana pode ser reduzido quando os níveis sérios de colesterol são controlados pela dieta ou tratamento farmacológico. Atualmente, existem muitos medicamentos capazes de reduzir as hiperlipidemias, sendo os mais usados as estatinas e os fibratos. Porém, se esse tratamento é eficiente, também é caro e não isento de efeitos colaterais, proporcionais a dose do medicamento utilizado.

O interesse no estudo dos lipídios surgiu no século XIX com Vogel, que em 1847 detectou a presença de colesterol nas placas de ateroma. No início do século XX, na Alemanha, estudos experimentais realizados com ratos demonstraram que estes, quando alimentados com dietas ricas em colesterol, desenvolveram hipercolesterolemia e lesões ateroscleróticas (BERTOLAMI & BERTOLAMI, 1996).

Amplas pesquisas epidemiológicas e experimentais realizadas nas últimas décadas estabeleceram os principais fatores de risco para a doença arterial coronariana conseqüente à aterosclerose. Entre elas, destacam-se forte correlação com o tabagismo, hipertensão arterial, hipercolesterolemia, HDL baixo, diabetes, presença de hipertrofia ventricular esquerda, obesidade, história familiar positiva, mulheres na menopausa sem o uso de reposição hormonal, estresse, sedentarismo e alguns hábitos relacionados ao

estilo de vida como dieta rica em calorias, gorduras saturadas, colesterol, sal e consumo de bebidas alcoólicas. Tais fatores mostraram-se independentes, variando, entretanto, a associação entre eles de acordo com as amostras populacionais em observação.

Investigações anatomopatológicas, epidemiológicas, clínicas e terapêuticas demonstraram a vinculação entre a hipercolesterolemia e a doença arterial coronariana. Por outro lado, a redução dos níveis plasmáticos de colesterol total e, particularmente, da fração LDL, têm-se mostrado eficaz para a diminuição de eventos coronarianos, normalização da função endotelial, estabilização e, até mesmo, regressão de lesões ateroscleróticas (GONÇALVES *et al.*, 2006).

O colesterol é indispensável na estrutura das membranas celulares, é o precursor de hormônios esteróides, ácidos biliares e vitamina D. Apesar de realizar funções indispensáveis ao organismo, ele se torna nocivo quando se está em excesso e sua concentração no sangue se torna elevada (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Estudos sobre a oxidação do colesterol em alimentos têm demonstrado as características biológicas dos óxidos formados, interferindo na morfologia e função da membrana celular, inibindo a biossíntese do próprio colesterol e sendo aterogênicos, citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (ESCARABAJAL & TENUTA-FILHO, 2005).

A fisiopatologia da aterosclerose mostra que ocorre injúria nas células endoteliais das artérias, provocando a sua modificação. A injúria química, que inclui a hipercolesterolemia e a injúria imunológica associada à hipertensão arterial, levam a maior impacto do sangue sobre a parede arterial. Aliado a esses fatores, a presença de toxinas e outros agentes, que modificam a permeabilidade das células endoteliais, permitem que lipoproteínas, especialmente o LDL oxidado, penetrem na parede arterial, alterando a capacidade tromborresistente do endotélio, provocando, assim, maior propensão para agregação das plaquetas no local da injúria. A proliferação destas lesões, no decorrer da vida, pode levar a obstrução das artérias e infarto do miocárdio.

O primeiro inibidor de HMG-Coa redutase, lovastatina, foi introduzido em 1987, e permitiu o desenvolvimento de compostos similares. Assim a estatina tornou-se uma das classes terapêuticas mais utilizadas atualmente. É eficaz em reduzir o colesterol e os eventos cardíacos.

Os flavonóides têm sido testados mostrando diversas atividades biológicas e estreitas correlações entre o seu consumo e doenças cardiovasculares. Estudos com apigenina e outros flavonóides comprovaram a ação antiinflamatória desses fármacos. Essa atividade, associada ao efeito hipolipêmico, são importantes, uma vez que no processo de aterosclerose ocorrem inflamações e depósito de colesterol nas artérias (LIMA *et al.*, 2001).

Park (2002) relatou os efeitos de rutina e ácido tânico como suplementos no metabolismo do colesterol em ratos. Neste estudo, os animais hiperlipidêmicos receberam 1 g de rutina e 1 g de ácido tânico, durante cinco semanas, e apresentaram alterações na atividade das enzimas HMG-Coa redutase, e colesterol acil transferase. Também os flavonóides promoveram maior excreção fecal de esteróides, levando ao decréscimo na absorção de colesterol da dieta e menores concentrações no plasma e fígado.

Os polifenóis poderiam inibir a agregação plaquetária por diferentes mecanismos, incluindo a inibição da lipoxigenase, ciclooxigenase e AMPc. Outros efeitos inibitórios de plaqueta incluem antagonismo do receptor de tromboxano, varredores de ROS como ânion superóxido, diminuição da atividade da fosfolipase C e inibição da peroxidação lipídica. Flavonóides também aumentam a produção de óxido nítrico pelo endotélio, que é potente inibidor da adesão e agregação plaquetária (DORNAS *et al.*, 2007).

Os flavonóides são eficientes inibidores da glicação de colágeno, uma das vias que podem desencadear o processo ateromatoso, por haver liberação de radicais livres. Em reações de glicação de carboidratos estes produtos podem provocar a oxidação da LDL, que tem potencial para danificar o endotélio (LIMA *et al.*, 2003).

Oliveira *et al.* (2001) estudaram a ação da morina, quercetina e ácido nicotínico, isoladamente e em associação, no metabolismo lipídico em ratos hiperlipidêmicos. O flavonóide morina apresentou redução do colesterol em relação ao controle, de 66,21%; os animais tratados com quercetina, redução de 68,10%; com ácido nicotínico, 48,45%; com ácido nicotínico e morina, 65,44%. Já os animais tratados com ácido nicotínico e quercetina, 58,58%. Com relação aos níveis de triglicéris, os ratos hiperlipidêmicos tratados com morina, reduziram 68,13%; com quercetina, 59,05%; com ácido nicotínico, 46,07%; com ácido nicotínico e morina, 71,33%; e com ácido nicotínico e quercetina, 61,28%.

Quercetina, baicaleína, naringina e naringenina foram associadas com redução de placa aterosclerótica em artéria carótida e aorta em animais alimentados com dieta rica em lipídeos (JUZWIAK *et al.*, 2005).

8.2 MATERIAIS E MÉTODOS

8.2.1 Cápsulas e comprimidos

Foram produzidos três lotes de cada forma farmacêutica contendo, respectivamente, as seguintes doses: 5 mg (equivalente a 2,5 mg/kg), 10 mg (5 mg/kg) e 25 mg (12,5 mg/kg).

8.2.2 Animais

Foram utilizados 54 coelhos da raça Nova Zelândia, albinos, com idade média de 55 dias, pesando em média 2,0 kg, provenientes do Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os animais foram mantidos em área experimental no Laboratório Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. Eles foram acondicionados em gaiolas individuais, com temperatura controlada na faixa entre 22^o-24^o C e fotoperíodo de 12 horas.

8.2.3 Período de Adaptação

Durante os primeiros cinco dias, os animais ficaram em processo de adaptação na área experimental. O regime alimentar constituiu-se de 120 g de ração comercial (Soma Alimentos[®]) e água *ad libitum*.

8.2.4 Indução da Hiperlipidemia

Após o período de adaptação foi feita a indução da hiperlipidemia em 48 animais. Para induzir a hiperlipidemia foi fornecido aos animais 120 g ração peletizada, contendo 1% (1,2 g) de colesterol (Vetec[®]), durante 28 dias.

8.2.5 Grupos Experimentais

Os animais foram separados aleatoriamente, em grupos de 6 animais, conforme descrito na TABELA 20.

TABELA 20 Constituição dos grupos experimentais - Hiperlipidemia

Grupos (n=6)	Característica dos animais
G1	Hipercolesterolêmico não tratado
G2	Normal
G3	Hipercolesterolêmico tratado com NA cápsula 5 mg
G4	Hipercolesterolêmico tratado com NA cápsula 10 mg
G5	Hipercolesterolêmico tratado com NA cápsula 25 mg
G6	Hipercolesterolêmico tratado com NA comprimidos 5 mg
G7	Hipercolesterolêmico tratado com NA comprimidos 10 mg
G8	Hipercolesterolêmico tratado com NA comprimidos 25 mg
G9	Hipercolesterolêmico tratado com Atorvastatina 10 mg

8.2.6 Tratamentos

Os animais foram tratados por um período de 28 dias de acordo com o grupo experimental. Trinta minutos após a administração do medicamento foi fornecido 120 g de ração a cada animal. O fornecimento de água durante todo o período foi *ad libitum*.

8.2.7 Dosagens de Parâmetros Sanguíneos

Os parâmetros sanguíneos colesterol total; triacilgliceróis; glicose; TGO; TGO; Gama GT; creatinina; e albumina foram dosados utilizando Kits Bioclin – Quibasa e equipamento multiparamétrico – Alizé.

A coleta de sangue foi realizada após 28 dias de tratamento. O sangue foi coletado pela veia marginal da orelha. Logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas em Centrífuga Fanem[®] (Modelo 206-BL) a 2000 rpm de velocidade por 15 minutos. Para a dosagem de glicose no plasma foi utilizado tubo de ensaio contendo fluoreto, que inibe as

enzimas da via glicolítica, inibindo o consumo de glicose após a coleta. As demais dosagens bioquímicas foram realizadas em plasma heparinizado.

8.2.8 Eutanásia

No fim do experimento os animais foram eutanasiados utilizando-se os anestésicos Xilazina (5 mg/kg) e Cetamina (20 mg/kg) por via muscular e posteriormente realizou-se a exanguinação (punção cardíaca).

8.2.9 Estatística

.O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com nove tratamentos e seis repetições. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste Dunnett.

8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da atividade hipocolesterolêmica da naringina foi realizada através de dosagens de parâmetros bioquímicos dos coelhos com hiperlipidemia induzida por colesterol.

Os resultados dos valores médios de colesterol total no plasma estão descritos na TABELA 21 e FIGURA 18. Observou-se que a adição de 1% de colesterol na dieta induziu a hipercolesterolemia em coelhos, elevando os níveis de colesterol em cerca 7,4 vezes, em relação ao grupo controle (G2).

Os resultados dos valores médios de colesterol total demonstraram que as variações foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre o grupo doente não tratado (G1) e os demais grupos, com exceção do grupo tratado com cápsulas de naringina na dose 25 mg (G5), o que demonstrou que os tratamentos interferiram nos níveis de colesterol total. Os teores de colesterol foram menores em todos os animais tratados com naringina, sendo os melhores resultados obtidos nos comprimidos na dose 10 mg (5 mg/kg), o que representou uma redução de 49,67%. Comparando-se os resultados obtidos com os animais tratados com atorvastina 10 mg, fármaco utilizado atualmente na

terapêutica das hiperlipidemias, a naringina apresentou maior capacidade redutora de colesterol total em animais hiperlipidêmicos.

TABELA 21 Valores médios de colesterol total no plasma de coelhos hiperlipidêmicos após 28 dias de tratamento com naringina.

Grupo	Colesterol total (mg/dL)	
	Média	% var.
G1 Hipercolesterolêmico não tratado	495,08 A	0,00
G2 Normal	66,70 B	-86,53
G3 Hipercolesterol. tratado com NA caps. 5 mg	348,65 B	-29,58
G4 Hipercolesterol. tratado com NA caps. 10 mg	302,04 B	-38,99
G5 Hipercolesterol. tratado com NA caps. 25 mg	434,27 A	-12,28
G6 Hipercolesterol. tratado com NA comp. 5 mg	296,13 B	-40,19
G7 Hipercolesterol. tratado com NA comp. 10 mg	249,18 B	-49,67
G8 Hipercolesterol. tratado com NA comp. 25 mg	392,86 B	-20,65
G9 Hipercolesterol. tratado com Atorvastatina. 10 mg	266,21 B	-42,19

Teste Dunnett a 5% de significância.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett.

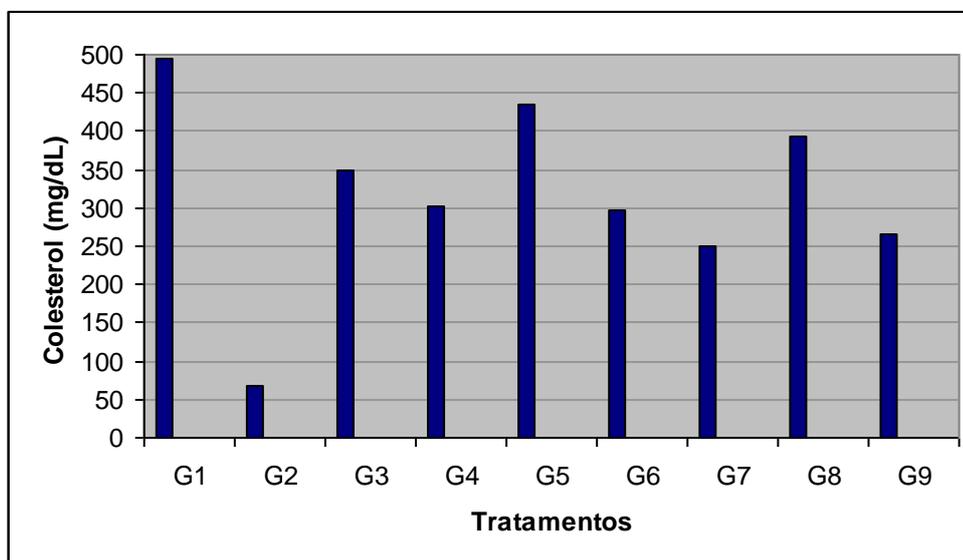


FIGURA 18 Médias de colesterol total em soro de coelhos após 28 dias de tratamento.

Os valores relativos aos níveis de colesterol-HDL, mostrados na TABELA 22, indicaram variações não significativas entre os grupos tratados com naringina, com exceção do grupo tratado com comprimidos de naringina na dose 25 mg (G8). Os resultados demonstraram aumento na concentração sanguínea de HDL, sendo que no

grupo G8 houve um aumento de 62% em sua concentração. Esses resultados são favoráveis, pois o HDL é responsável pelo transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, onde sofre um processo de metabolização. Valores aumentados de HDL são desejados na prevenção de doença arterial coronariana.

TABELA 4 Valores médios de HDL-colesterol e triacilgliceróis em plasma de coelhos hiperlipidêmicos após 28 dias de tratamento com naringina.

Grupo	HDL-colesterol (mg/dL)		Triacilgliceróis (mg/dL)	
	Média	% var.	Média	% var.
G1 Hipercolesterolêmico não tratado	45,24 A	0,00	110,68 A	0,00
G2 Normal	39,70 A	-12,25	145,96 B	31,88
G3 Hipercolest. tratado com NA cáps. 5 mg	51,59 A	14,04	74,58 B	-32,62
G4 Hipercolest. tratado com NA cáps. 10 mg	50,88 A	12,47	140,37 A	26,82
G5 Hipercolest. tratado com NA cáps. 25 mg	50,21 A	11,00	148,06 B	33,78
G6 Hipercolest. tratado com NA comp. 5 mg	61,83 A	36,67	68,27 B	-38,32
G7 Hipercolest. tratado com NA comp. 10 mg	53,46 A	18,17	102,00 A	-7,85
G8 Hipercolest. tratado com NA comp. 25 mg	73,30 B	62,02	114,20 A	3,18
G9 Hipercolest. tratado com Atorvastatina	55,46 A	22,59	345,68 B	212,32

Teste Dunnett a 5% de significância.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett.

Quanto aos triacilgliceróis plasmáticos (TABELA 22) os grupos tratados com comprimidos e cápsulas de naringina na dose 5 mg apresentaram redução significativa ($p > 0,05$) dos triglicerídeos em relação ao grupo doente não tratado. Como a lipase é a enzima que hidrolisa os triacilgliceróis, esses resultados são promissores, pois relatos na literatura (LIMA *et al.*, 1999) identificaram a rutina e a naringina como os flavonóides que mais aumentaram a atividade da lipase, em uma percentagem de 74,28% e 124,77%, respectivamente. Estas substâncias podem atuar reduzindo a hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia em animais e, futuramente, em humanos.

Diversos mecanismos têm sido atribuídos aos flavonóides para explicar seus efeitos no metabolismo lipídico. Um destes envolve suas ações no aumento da excreção de sais biliares nas fezes, e o outro a capacidade de aumentar a atividade do sistema microsomal hepático (SANTOS *et al.*, 1999).

Estudos têm mostrado que os flavonóides naringina e hesperidina reduzem os níveis de colesterol hepático e plasmático através da inibição da enzima HMG-CoA redutase, enzima chave na síntese do colesterol, e acil CoA colesterol transferase, enzima que esterifica o colesterol livre utilizando ácido graxo. O colesterol esterificado é armazenado na célula como gotículas ou, no caso do fígado, é incorporado às VLDL e exportado para o plasma (SILVA *et al.*, 2001).

Os flavonóides agem como co-fatores da enzima colesterol esterase, responsável pela hidrólise do colesterol. Foi demonstrado que esses compostos reduzem a formação de trombos e a agregação plaquetária em artéria aorta de coelhos, pela redução da síntese de colágeno. Esse mecanismo está associado com a sua capacidade de reagir com radicais livres, por diminuir a síntese de prostaglandinas e por inibir a peroxidação lipídica. Estudos demonstraram que a associação de flavonóides e colestiramina resultou em uma menor absorção de ácidos biliares. Como consequência, há maior conversão de colesterol a ácidos biliares, pelo fígado. Esse efeito pode aumentar os níveis de receptores LDL e aumentar a atividade da enzima HMG-CoA redutase. E assim, o colesterol dos hepatócitos é restaurado pelo aumento da captação de LDL do plasma, mediado pela expressão aumentada dos LDL receptores (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Lipoproteínas de baixa densidade podem ser modificadas por radicais que oxidam os ácidos graxos poliinsaturados na molécula LDL. LDLs modificadas são facilmente absorvidas por macrófagos e tornam-se tóxicas para o endotélio dos vasos sanguíneos. Isso possibilita por fim, a formação de placas ateroscleróticas. Estudos *in vitro* demonstraram que os flavonóides inibem a modificação oxidativa de LDLs pelos macrófagos por meio da inibição da hidroxilação da LDL, ou por oxidação preventiva do α -tocoferol, que está presente em lipoproteínas (ARAÚJO *et al.*, 2005).

Os flavonóides, ainda, são responsáveis por ativar sistemas enzimáticos, como o citocromo P-450 e b5, e esta ação afeta todo o metabolismo animal, incluindo o de lipídeos. Estes compostos bioativos aumentam a excreção de ácidos biliares ao ativar o citocromo P-450, e conseqüentemente, reduzem os níveis de colesterol (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

TABELA 23 Valores médios de creatinina e albumina em plasma de coelhos hiperlipidêmicos após 28 dias de tratamento com naringina.

Tratamentos	creatinina (mg/dL)		albumina (mg/dL)	
	Conteúdo	% Variação	Conteúdo	% Variação
G1 Hipercolesterolêmico não tratado	1,41 A	0,00	4,70 A	0,00
G2 Normal	1,62 B	14,54	4,45 A	10,87
G3 Hipercolest. tratado com NA cáps. 5 mg	1,85 A	31,09	5,27 A	12,09
G4 Hipercolest. tratado com NA cáps. 10 mg	1,38 A	-2,13	5,42 A	15,42
G5 Hipercolest. tratado com NA cáps. 25 mg	2,11 B	49,41	5,55 A	18,09
G6 Hipercolest. tratado com NA comp. 5 mg	2,02 A	43,26	5,40 A	14,89
G7 Hipercolest. tratado com NA comp. 10 mg	2,08 B	47,52	5,33 A	13,40
G8 Hipercolest. tratado com NA comp. 25 mg	2,41 B	70,92	5,70 B	21,28
G9 Hipercolest. tratado com Atorvastatina	2,36 B	67,38	6,00 B	23,73

Teste Dunnett a 5% de significância.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett.

A creatinina (TABELA 23) aumentou em todos os tratamentos com a naringina, em comparação ao grupo doente, com exceção ao grupo tratado com cápsulas na dose 5 mg/kg. Entretanto, apenas os grupos G5, G7, G8 e G9 apresentaram resultados estatisticamente significativos ($p>0,05$). A creatinina do soro é predominantemente um produto endógeno do catabolismo da creatina do músculo. Ela é formada nos animais a partir da arginina, podendo acumular-se no músculo e é reservatório de grupos fosfatos. Seus níveis são alterados principalmente em insuficiência renal, obstrução urinária e injúria muscular severa.

Em relação à albumina houve aumento nas concentrações plasmáticas em todos os tratamentos. Esse aumento foi estatisticamente significativo ($p>0,05$) nos grupos tratados com comprimidos de naringina 25 mg e com atorvastatina 10 mg. Proteínas como albumina são reduzidas em situações nas quais ocorra deficiência de magnésio, levando a processos inflamatórios. Os diversos tratamentos afetaram pouco o nível de albumina, fato importante, considerando que a maioria das proteínas são sintetizadas pelo fígado. Geralmente, reduções nos níveis plasmáticos podem estar associados à insuficiência renal ou hepática.

Flavonóides possuem efeitos sobre diversas proteínas, tais como fosfoinositídeo quinase 3 (PK3) e proteína quinase c (PKC), que estão sendo consideradas com papel chave em muitas respostas celulares, incluindo a multiplicação celular e apoptose. Muitos são os fatores que podem alterar os níveis de proteínas no plasma, mas os efeitos antiinflamatórios dos flavonóides podem minimizar esses problemas.

A aspartato amino transferase (AST) ou TGO catalisa a reação ácido oxalacético + ácido glutâmico \leftrightarrow ácido alfa-cetoglutarico + ácido aspártico. A AST é encontrada no fígado, coração, músculos esqueléticos, rins e pâncreas, sendo que o aumento de sua atividade no plasma pode indicar distúrbios em células desses tecidos e órgãos (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Comparando-se os resultados (TABELA 24) observou-se que todos os grupos, exceto o tratado com cápsulas de naringina 5 mg (G3), foram estatisticamente significativos ($p>0,05$) em relação ao grupo doente. Os animais tratados com atorvastatina apresentaram as maiores atividades de AST (61,77%). Nos grupos tratados com naringina houve aumento de até 44,62% e redução de até 45,40%.

TABELA 24 Valores médios de TGO, TGP e Gama-GT em plasma de coelhos hiperlipidêmicos após 28 dias de tratamento com naringina.

Tratamentos	TGO (UI)		TGP (UI)		Gama-GT (UI)	
	Conteúdo	% Variação	Conteúdo	% Variação	Conteúdo	% Variação
G1 Hipercolesterolêmico não tratado	88,38 A	0,00	88,40 A	0,00	15,33 A	0,00
G2 Normal	60,33 B	-31,72	158,33 B	79,11	17,00 A	10,87
G3 Hipercolest. tratado com NA cáps. 5 mg	66,86 A	-24,33	118,76 A	34,35	17,50 A	14,13
G4 Hipercolest. tratado com NA cáps. 10 mg	127,8 B	44,62	123,80 A	40,05	16,63 A	8,46
G5 Hipercolest. tratado com NA cáps. 25 mg	58,80 B	-33,46	82,80 A	-6,33	13,35 A	-12,93
G6 Hipercolest. tratado com NA comp. 5 mg	48,25 B	-45,40	80,00 A	-9,50	17,76 A	15,87
G7 Hipercolest. tratado com NA comp. 10 mg	62,73 B	-29,01	69,67 A	-21,19	16,40 A	6,96
G8 Hipercolest. tratado com NA comp. 25 mg	89,76 B	1,58	111,50 A	26,24	20,00 A	30,43
G9 Hipercolest. tratado com Atorvastatina	142,95 B	61,77	162,13 A	83,41	29,00 A	89,13

Teste Dunnett a 5% de significância.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett.

Atividades plasmáticas aumentadas de AST sugerem danos às células hepáticas, renais ou cardíacas, podendo ser provocadas até pela forma de coleta sanguínea. Estudos têm demonstrado que o estresse provocado por calor resulta em elevação na atividade da AST (LINDENA & TRAUSTSCHOLD, 1986).

A alanina amino transferase (ALT) ou TGP catalisa a reação do ácido pirúvico + ácido glutâmico \leftrightarrow alanina + ácido acetoglutárico. A ALT é considerada específica para o fígado e suas atividades plasmáticas servem como indicadores de injúrias hepáticas. Em coelhos, existem altas concentrações de ALT no músculo cardíaco (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Os resultados obtidos (TABELA 24) mostram diferenças significativas ($p > 0,05$) apenas para os animais do grupo controle (G2) em relação ao doente não tratado, indicando que as alterações nas concentrações de ALT estão relacionadas à hiperlipidemia e não aos tratamentos com naringina.

Houve aumento nas concentrações plasmáticas de gama-GT em todos os tratamentos, sendo as maiores elevações encontradas nos grupos tratados com comprimidos de naringina 5 mg (15, 87%) e com atorvastatina 10 mg (89,13%). Entretanto nenhum resultado foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$) em relação ao grupo doente não tratado (G1) e ao grupo controle (G2).

A determinação da atividade da gama-GT (gama glutamil transferase) é útil na avaliação de hepatopatias agudas e crônicas, estando à atividade enzimática elevada nos quadros de colestase intra ou extra-hepática. Os níveis de gama-GT também se elevam na doença hepática alcoólica aguda ou crônica e nas neoplasias primárias ou metatásticas. Essa enzima catalisa a transferência do ácido glutâmico de um peptídeo para outro, ligando-o ao grupo gama-carboxílico, além de facilitar a transferência transmembranas do ácido glutâmico.

Todos os tratamentos aumentaram a concentração plasmática de glicose (TABELA 25), sendo que o grupo tratado com atorvastatina apresentou a maior percentagem de elevação (58,31%). A variação na percentagem de glicose foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) nos grupos G5, G6, G8 e G9.

TABELA 25 Valores médios de glicose no plasma de coelhos hiperlipidêmicos após 28 dias de tratamento com naringina.

Grupo	Glicose (mg/dL)	
	Média	% var.
G1 Hipercolesterolêmico não tratado	142,20 A	0,00
G2 Normal	131,40 A	-7,59
G3 Hipercolesterolêmico tratado com NA cáps 5 mg	153,38 A	7,86
G4 Hipercolesterolêmico tratado com NA cáps. 10 mg	52,65 A	7,35
G5 Hipercolesterolêmico tratado com NA cáps. 25 mg	179,18 B	26,01
G6 Hipercolesterolêmico tratado com NA comp. 5 mg	174,90 B	23,00
G7 Hipercolesterolêmico tratado com NA comp. 10 mg	164,44 A	15,84
G8 Hipercolesterolêmico tratado com NA comp. 25 mg	191,10 B	34,39
G9 Hipercolesterolêmico tratado com Atorvastatina	225,12 B	58,31

Teste Dunnett a 5% de significância.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett.

8.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições experimentais estabelecidas neste trabalho permitiram concluir que a naringina nas formas farmacêuticas cápsulas e comprimidos e nas doses avaliadas reduziram clinicamente as concentrações plasmáticas de colesterol total.

Os melhores efeitos hipocolesterolemiantes foram obtidos com a forma farmacêutica comprimido nas concentrações 5 e 10 mg, respectivamente. Esperava-se maior potencial redutor de colesterol total nos animais tratados com naringina 25 mg. Entretanto, a maior dose não demonstrou maior percentual de redução. Isso poderia ser explicado por eventual dificuldade de concentrações elevadas do fármaco nos processos de absorção. Os tratamentos com a naringina e com o fármaco atorvastatina não demonstraram efeito redutor de triacilgliceróis plasmáticos.

Além do efeito redutor do colesterol total pode-se concluir que a naringina aumentou as concentrações plasmáticas de colesterol-HDL, o que associado ao efeito hipocolesterolemiantes representaria uma nova alternativa para o tratamento de Dislipidemias e prevenção da aterosclerose e doença arterial coronariana.

Referências

1. ARAUJO, P.W.B.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; VASCONCELOS, H.D.; ALMEIDA, J.R.G.S. *Flavonóides e hipertensão*. **Revista Brasileira de Hipertensão**, 12(3): 188-196, 2005
2. BERTOLAMI, M.C.; BERTOLAMI, V. *A hipercolesterolemia e as demais hiperlipidemias*. **Revista Brasileira de Medicina**, 43: 112-121, 1996.
3. CHATTAS, A.E.; PIMENTA, J. *Eficácia da atorvastatina sem administração diária*. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 89(5): 325-332, 2007.
4. DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. *Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 28(3): 241-249, 2007.
5. ESCARABAJAL, C.; TENUTA-FILHO, A. *Estabilidade oxidativa do colesterol em ovo integral em pó*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 41 (4): 483-490, 2005.
6. GONÇALVES, M.C.R.; DINIZ, M.F.F.M.; BORBA, J.D.C.; NUNES, X.P.; BARBOSA-FILHO, J.M. *Berinjela (Solanum melongena L.) – mito ou realidade no combate as dislipidemias?* **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(2) 252-257, 2006.
7. JUZWIAK, S.; WOJCICKI, J.; MOKRZYCKI, K.; MARCHLEWICZ, M.; BIALECKA, M.; WENDA-ROZEWICKA, L.; GAWRONSKA-SZKLARZ, B.; DROZDZIK, M. *Effect of flavonoids on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits*. **Pharmacol. Rep.** 57(5): 604-609, 2005.
8. LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; LEÃO, M.A. *Efeitos de flavonóides e corantes naturais sobre a atividade da lípase*. **Revista da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas**, 21: 29-36, 1999.
9. LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; STRINGHRITA, P.C.; TINOCO, A.L.A.; SILVA, J.F. *Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos*. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 38(4): 196-200, 2001.
10. LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J. *Efeito dos flavonóides quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos*. **Revista Nutrição**, 16(3): 305-314, 2003.
11. LINDENA, J.; TRAUSTSCHOLD, I. *Catalitic enzyme activity concentration in plasma of man, sheep, dog, cat, rabbit, guinea pig, rat and mouse*. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.** 24: 11-18, 1986.
12. OLIVEIRA, T.T.; RICARDO, K.F.S.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; SOARES, J.F. *Effect of flavonoids morin, quercetin and nicotin acid on lipid metabolism of rats experimentally fed with triton*. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 44(3): 263-267, 2001.

13. OLIVEIRA, T.T.; LOPES, R.M.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; MORAES, G.H.K.; SILVA, R.R.; LEÃO, M.A.; PINTO, J.G. *Efeito de diferentes doses de rutina sobre proteínas totais, enzimas aspartato amino transferase e alanina amino transferase no soro de coelhos.* **Revista de Ciências Farmacêuticas**, 24(1): 27-32, 2003.
14. OLIVEIRA, T.T.; RICARDO, K.F.S.; ALMEIDA, M.R.; COSTA, M.R.; NAGEM, T.J. *Hypolipidemic effect of flavonoids and cholestyramine in rats.* **Latin American Journal of Pharmacy**, 26(3): 407-410, 2007.
15. PARK, S. *Efecct of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats.* **Nutr. Res.** 22: 283-295, 2002.
16. SANTOS, K.F.R.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; SOARES, J.F. *Efeito das associações de morina-ácido nicotínico e quercetina-ácido nicotínico no controle de lipídeos.* **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 31(1): 05-07, 1999.
17. SILVA, R.R.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; ALBINO, L.F.T.; ALMEIDA, M.R.; MORAES, G.H.K.; PINTO, J.G. *Efeito hipolipidêmico dos flavonóides naringina e rutina.* **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, 51(3): 01-13, 2001.

9 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- A naringina apresentou maiores taxas de solubilidade aquosa e maior percentagem de cedência do que o seu metabólito ativo naringenina. Dessa forma, o primeiro fármaco está mais indicado para a administração oral, pois irá apresentar maior biodisponibilidade.
- A avaliação da estabilidade da naringina, em condições fisiológicas simuladas, demonstrou que o fármaco é estável nos fluidos gastrintestinais. As variações no pH e na composição das enzimas presentes no estômago e intestino não alteraram a estabilidade do fármaco.
- A avaliação da interação entre a naringina e os excipientes selecionados para as formulações de comprimidos e cápsulas, através da calorimetria exploratória diferencial, demonstrou que os excipientes na formulação proposta são compatíveis.
- O método para determinação de naringina foi validado, permitindo a quantificação do fármaco em formas farmacêuticas sólidas. A técnica proposta demonstrou ter linearidade, precisão e exatidão, além de ser específica e robusta.
- A análise física e físico-química realizada demonstrou que todos os lotes desenvolvidos apresentaram-se em conformidade com as especificações farmacopéicas.
- As cápsulas apresentaram maior percentagem de cedência da naringina, nos três meios avaliados. Esse resultado sugere que essa forma farmacêutica seja a mais adequada para a administração oral da naringina.
- A avaliação antifúngica demonstrou o potencial antifúngico promissor da naringina e naringenina.
- Os tratamentos com naringina reduziram as concentrações plasmáticas de glicose e colesterol total nos animais com diabetes induzida por aloxano. A maior percentagem de redução foi obtida com a forma farmacêutica cápsula na concentração 10 mg.
- Além de a ação hipoglicemiante observou-se que a naringina aumentou as concentrações de colesterol-HDL e reduziu o colesterol total nos animais diabéticos.

Esses resultados representam, no futuro, uma nova alternativa terapêutica para pacientes diabéticos e que apresentam níveis elevados de colesterol plasmático.

- A avaliação da atividade hipocolesteremiante permitiu concluir que os tratamentos com naringina reduziram clinicamente as concentrações plasmáticas de colesterol total e aumentaram o colesterol-HDL plasmático. Os melhores efeitos hipocolesteremiante foram obtidos com a forma farmacêutica comprimido nas concentrações 5 e 10 mg, respectivamente.
- A naringina se apresentou como um promissor agente com atividade hipoglicemiante e hipocolesteremiante. Estudos complementares, tais como, avaliação toxicológica e de parâmetros farmacocinéticos, deverão ser realizados, objetivando a disponibilização deste fitofármaco para a terapêutica de Diabetes, Dislipidemias e prevenção de aterosclerose.

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](#)