

Controle da Hiperlipidemia em Coelhoos Tratados com Flavonóides e Corantes Naturais do Urucum

Leonardo R. P. LIMA¹, Tânia T. OLIVEIRA^{1*}, Tanus J. NAGEM², Aloisio S. PINTO³,
Paulo C. STRINGHETA⁴, Maria G. A. OLIVEIRA¹, Adelson L. A. TINOCO⁵,
Marly L. OLIVEIRA¹ & José F. SILVA⁶

¹ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ² Depto. de Química da Univ. Federal de Ouro Preto, 5400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. ³ Depto. de Veterinária da Univ. Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ⁴ Depto. de Tecnologia de Alimentos, Univ. Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ⁵ Depto. de Nutrição, Univ. Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ⁶ Depto. de Zootecnia, Univ. Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO. Tendo em vista que a hiperlipidemia se constitui em fator de risco para o sistema cardiocirculatório, levando ao aparecimento da aterosclerose, o presente trabalho foi desenvolvido, objetivando o controle de lipídeos com os flavonóides luteolina e apigenina, bem como do corante natural do urucum, bixina 30% e bixina 95%, em coelhos hiperlipidêmicos induzidos com triton. Decorridos 20 horas da aplicação do triton, foram administrados os compostos na dose de 10 mmol/Kg e, 24 horas após, dosados no soro dos animais, colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis. Os resultados mostram que os tratamentos foram eficazes em reduzir os níveis de colesterol total; à exceção de bixina 30%, mantiveram os níveis elevados de colesterol-HDL e a bixina 30% diminuiu significativamente os valores de triacilgliceróis.

SUMMARY. "Control of hyperlipidaemia in treated rabbits with flavonoids and natural dyes of urucum". The hyperlipidaemia is a risk factor for the development of atherosclerosis in the cardiovascular system. The present work evaluated the effects of three compounds isolated from the urucum, the flavonoids luteolin and apigenin and the natural coloring bixin (30% and 95%), on the control of serum lipids in triton-induced hyperlipidaemic rabbits. After 20 hours triton 300mg/Kg weight was administered intraperitoneal (i.p.) the rabbits were injected i.p. with bixin 30%, bixin 95%, luteolin or apigenin at the dose of 10 mmol/Kg weight. 24 hours latter total cholesterol, cholesterol-HDL and triacylglycerols were dosed in the serum of the animals. The results showed that all compounds were effective in reducing the levels of total cholesterol. Except bixin 30% the treatments increased the levels of cholesterol-HDL, notably apigenin by about three fold. Bixine 30% was the only treatment that reduced the levels of triacylglycerols. It may be suggested that these natural compounds may have beneficial effects in controlling serum lipids levels when used as flavoring or coloring of foods.

INTRODUÇÃO

Inegável foi a colaboração dos aditivos sintéticos na melhoria das características sensoriais dos alimentos e na sua preservação, contribuindo de forma significativa na expansão das agroindústrias. Entretanto, nunca se deixou de considerar a necessidade da substituição parcial ou total desses sintéticos por substâncias naturais, com o intuito, principalmente, de melhorar a qualidade do alimento a ser consumido.

Nesse sentido, pesquisadores têm estudado uma gama de espécies cultivadas e exóticas, na tentativa de se dispor, em curto espaço de tempo, de uma variedade de substâncias com caracte-

rísticas que possam, economicamente, atender às exigências mercadológicas¹.

Estudos desenvolvidos² mostram que os efeitos da época de controle de plantas daninhas no desenvolvimento de urucueiros (*Bixa orellana*), na presença e ausência de irrigação em diferentes períodos mostram que nos períodos de abril a julho e agosto a novembro houve maior desenvolvimento desta cultura.

Melhoramento genético tem sido pesquisado também através de técnicas de hibridação para se obter cultivares mais resistentes e com maior produção de sementes de urucum³.

A toxicidade de alguns corantes sintéticos,

PALAVRAS-CHAVE: Luteolina, Apigenina Bixina, Hiperlipidemia, Coelhoos.
KEY WORDS: Luteolin, Apigenin, Bixin, Hyperlipidaemia, Rabbits.

* Autor para correspondência.

quando utilizados por um longo período pela indústria de alimentos, foi generalizada a todos os corantes sintéticos, fazendo desses pigmentos uma espécie de aditivo indesejável ao consumidor ⁴.

Muito embora, ainda seja grande a utilização de corantes sintéticos, eles estão cedendo espaço rapidamente para os naturais ⁵.

O corante de urucum apresenta-se convencionalmente de duas formas: em extrato lipossolúvel (solúvel em óleo/óleo-resina), na forma dispersível, no qual a bixina é o princípio ativo, e em extrato hidrossolúvel, no qual a nor-bixina é o princípio ativo ^{5,6}.

Harborne ⁷ relata o isolamento do urucum de flavonóides derivados da quercetina, canferol e da isoramnetina.

Flavonóides polihidroxilados, como a luteolina, fisetina e quercetina, possuem atividade antiproliferativa em presença de diferentes linhagens de células cancerígenas (Ex: leucemia, câncer gástrico, do cólon, ovariano) ⁸⁻¹⁰.

Estudos com apigenina mostram várias atividades biológicas para este flavonóide. Varma ¹¹ mostra o seu efeito inibidor, na concentração de 10^{-4} M, sobre a aldose redutase (98% de inibição). Esta enzima converte açúcares em álcool e pode formar cataratas em indivíduos diabéticos.

Outros pesquisadores testaram a ação antiinflamatória de apigenina dimetil éter, mostrando que este composto, na dose de 75 mg/Kg de peso, apresentou inibição em processos inflamatórios em patas de ratos, cujo edema foi induzido por carragenina ¹². Também foi verificado a capacidade desta substância de inativar o vírus HSV1 ¹³.

Dentro da busca de novas ações biológicas para a classe de flavonóides e também dos corantes do urucum, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de testar o efeito de bixina (30%), bixina (95%), bem como dos flavonóides luteolina e apigenina, também presentes no urucum, em coelhos com hiperlipidemia induzida com triton.

MATERIAL E MÉTODOS

As substâncias utilizadas nos testes biológicos foram extraídas do urucum sendo que os flavonóides foram purificados por cromatografia preparativa líquida de alta eficiência.

Este experimento foi instalado no delineamento inteiramente ao acaso, com seis tratamentos, em seis repetições.

Foram utilizados coelhos da raça Nova Ze-

lândia, machos, com peso médio de 2500 ± 200 g e idade média de oito semanas, provenientes do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Os animais receberam ração comercial Nutricoeelhos e água à vontade.

Após um período de 5 dias de adaptação em gaiolas apropriadas, os coelhos foram separados em 6 grupos, contendo cada um 6 animais, distribuídos ao acaso, que receberam as substâncias, conforme descrito:

Grupo 1 - (Ração), Grupo 2 - (Ração + Triton), Grupo 3 - (Ração + Triton + Bixina, 30%), Grupo 4 - (Ração + Triton + Bixina, 95%), Grupo 5 - (Ração + Triton + Luteolina), Grupo 6 - (Ração + Triton + Apigenina).

Para induzir a hiperlipidemia, foi administrado triton (Sigma St Louis, MO, USA), na dose de 300 mg/ Kg de peso, dissolvido em NaCl 0,9%, por via intraperitoneal. Após 20 horas da administração do Triton, foram administradas as substâncias (apigenina, luteolina, bixina a 30% e a 90%) na dose de 10 mmol/Kg de peso corporal, também, por via intraperitoneal.

Decorridos 24 horas dessas administrações, foram coletadas amostras de sangue dos animais, através da veia marginal da orelha, sendo, em seguida, centrifugadas a $7100 \times G$, durante 15 minutos, para obtenção do soro. As dosagens sorológicas foram efetuadas, utilizando-se kits Biolab e o aparelho Alizê (Analisador Automático de Bioquímica). Os resultados obtidos foram expressos em mg/dL de colesterol, colesterol-HDL e triacilgliceróis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos em mg/dL de colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos observa-se que a bixina 30% foi mais eficaz na redução de colesterol total do que a bixina 90%. A primeira apresentou uma percentagem de variação de 61,73%, enquanto a segunda reduziu em 38,25%. Nota-se também que os flavonóides reduziram o colesterol total, a luteolina em 52,59% e a apigenina em 49,88%. Possivelmente, a bixina a 30% deve ter apresentado um resultado melhor que a bixina à 95%, porque a primeira deve estar misturada a concentrações maiores de flavonóides e a bixina a 95% não contém os flavonóides.

Estes resultados são interessantes uma vez que na utilização de medicamentos usuais se

Grupos	Colesterol (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + Triton
1-Ração (R)	76,16 ± 2,78	-	-
2-R + Triton (T)	676,04 ± 43,15	-	-
3-R + T + Bixina 30%	258,73 ± 42,01 b	239,72 *	-61,73 *
4-R + T + Bixina 95%	417,44 ± 23,80 a	448,11 *	-38,25 *
5-R + T + Luteolina	320,54 ± 41,29 ab	320,88 *	-52,59 *
6-R + T + Apigenina	338,81 ± 21,67 ab	344,87 *	-49,88 *

Tabela 1. Valores médios de colesterol total (±erro-padrão) de coelhos hiperlipidêmicos induzidos com triton.

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

* Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett (P<0,05).

DMS (diferença mínima significativa) Dunnett = 84,10 mg/dL.

Grupos	Colesterol-HDL (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + Triton
1-Ração (R)	284,96 ± 36,01	-	-
2-R + Triton (T)	403,51 ± 60,46	-	-
3-R + T + Bixina 30%	274,20 ± 35,58 c	-3,78	-32,05
4-R + T + Bixina 95%	575,01 ± 93,39 b	101,79 *	42,50 *
5-R + T + Luteolina	488,81 ± 96,63 bc	71,54 *	21,14
6-R + T + Apigenina	1.539,91 ± 12,72 a	440,40 *	281,63 *

Tabela 2. Valores médios de colesterol-HDL (±erro-padrão) de coelhos hiperlipidêmicos induzidos com triton.

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

* Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett (P<0,05).

DMS (diferença mínima significativa) Dunnett = 164,66 mg/dL.

Grupos	Triacilgliceróis (mg/dL)	% de variação em relação a:	
		Ração	Ração + Triton
1-Ração (R)	179,45 ± 8,18	-	-
2-R + Triton (T)	1.501,82 ± 95,36	-	-
3-R + T + Bixina 30%	170,25 ± 22,11 b	-5,13	-88,66 *
4-R + T + Bixina 95%	1.694,00 ± 27,37 a	844,00 *	12,60 *
5-R + T + Luteolina	1.530,38 ± 51,83 a	752,82 *	1,90
6-R + T + Apigenina	1.586,03 ± 109,35 a	783,83 *	5,61

Tabela 3. Valores médios de triacilgliceróis (±erro-padrão) de coelhos hiperlipidêmicos induzidos com triton.

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

* Estatisticamente diferente dos grupos-controle pelo teste de Dunnett (P<0,05).

DMS (diferença mínima significativa) Dunnett = 166,68 mg/dL.

utiliza um medicamento para controle de colesterol e outro para controle de triacilgliceróis.

Novos estudos deverão ser conduzidos para que se possa ter o mecanismo de ação destes compostos.

De acordo com os resultados apresentados no Tabela 2, observa-se que os tratamentos efetuados, com a exceção de bixina 30%, elevaram os níveis de colesterol-HDL, sendo significativos para bixina 95% e para a luteolina, em relação

ao grupo 2 (R + Triton), que já se encontrava hiperlipidêmico. Deste modo, os resultados são positivos, visto que esta lipoproteína realiza o transporte do colesterol da circulação periférica para o fígado, onde será metabolizado. Tanto a bixina nas duas concentrações quanto a apigenina e luteolina foram interessantes no controle do colesterol-HDL. Nos seus efeitos farmacológicos é interessante lembrar que se os seus níveis se mantêm constantes ou se são aumentados pelo efeito de constituintes químico isto é bom para o organismo animal. Esta lipoproteína retira colesterol da circulação sanguínea e portanto deve se manter em seus níveis ou ser aumentada. Esta ação já pode ser considerado um dos mecanismos de ação dos compostos testados.

Na Tabela 3, observa-se que os níveis de triacilgliceróis tiveram uma maior percentagem de redução, utilizando-se também a bixina à 30%.

Para explicar o mecanismo de ação de alguns flavonóides, pesquisadores têm mostrado diversos dos seus efeitos biológicos.

Flavonóides têm apresentados uma variedade de papéis em células de mamíferos. Muitos possuem atividade antioxidante, antialérgica, anti-hemorrágica. Eles também inibem diversas enzimas, como as fosfolipases, ciclooxigenase, lipoxigenase e aldose redutase ^{12, 14}.

Estudos realizados ¹⁵ mostram o efeito de flavonóides sobre a estrogênio sintetase citocromo p-450 que catalisa a conversão de androgênio para estrogênios. Diversos flavonóides têm ação inibidora sobre a aromatização da androstenediona para estrona e de testosterona para estradiol. Segundo estes pesquisadores, os flavonóides podem competir com os esteróides e sua interação com certas monoxigenases alteram o metabolismo dos hormônios esteroidais. Esta ação se reverte de grande importância, visto que os glicorticóides aumentam a taxa de mobilização de gordura pelo aumento da permeabilidade da membrana celular.

Além da capacidade de reduzir lipídeos na circulação sanguínea, como mostram nossos resultados, outros pesquisadores relatam que diversos eventos que ocorrem nas desordens cardíacas, como a aterosclerose, podem ser prevenidas ou interrompidas em seus vários processos pela ação dos flavonóides.

Nestes eventos, tem-se que os monossacárideos, ao sofrerem auto-oxidação, provocam abertura de cadeias em estruturas de colágenos ligados à açúcares (tais como glicose, manose, galactose, xilose, frutose, etc.). Ocorre uma gli-

cação, que é uma condensação não enzimática, no qual um açúcar reage com uma amina, produzindo um glicato. Os produtos formados são chamados compostos de Amadori, quando ocorre uma reação entre um carboidrato da classe das aldoses e uma amina. Também formam-se glicatos, chamados produtos de Heys, que são formados pela reação entre um carboidrato da classe das cetoses e uma amina. Os flavonóides podem atuar nesta etapa, impedindo a glicação ¹⁶.

Logo após a reação de glicação, os glicatos reagem com o LDL e ocorre uma glico-oxidação. Nestas reações, formam-se radicais livres e também o LDL pode ser oxidado. Os produtos finais da glicação (AGE) se ligam à receptores (RAGE) nas células endoteliais e fagócitos mononucleares. Nesta etapa, os flavonóides podem atuar impedindo a oxidação do LDL ¹⁷. Esta etapa pode estar associada à uma replicação viral e/ou a uma replicação bacteriana, que com seus compostos antigênicos e toxinas inflamatórias são responsáveis pela ativação dos leucócitos e liberação de mediadores inflamatórios. Após a ativação dos leucócitos, ocorre a adesão e diapedese. Em seguida, ocorre uma liberação de fatores inflamatórios que vão para as células musculares e há estímulo de formação de células em espuma e proliferação celular. Quando todos os processos associados ocorrem, forma-se a placa aterosclerótica com depósito de colesterol, levando à oclusão da artéria, resultando em isquemia e ativação de várias proteases. Esta ativação das proteases local e sistêmica induz à instabilidade da placa e degeneração dos miócitos. Os flavonóides, além de impedirem a glicação e a oxidação do LDL, atuam também nestes processos como anti-vírus, anti-bacterianos e anti-inflamatórios, bem como se ligam a receptores de estrogênios, provocando efeitos benéficos na transdução de sinais ¹⁸.

Recentes estudos sobre o mecanismo de ação dos flavonóides no metabolismo lipídico têm mostrado que estes compostos são capazes de aumentar a atividade da lipase, enzima que hidrolisa os triacilgliceróis ¹⁹.

Pode-se concluir que a apigenina tem um efeito melhor sobre os níveis de colesterol HDL. Já para os níveis de colesterol e triacilgliceróis o melhor tratamento foi o de bixina a 30%. Portanto é possível sugerir que a bixina como corante e a apigenina como flavonoide flavorizante são substâncias indicadas como as de maiores efeitos benéficos sobre os níveis de lipídeos séricos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Filho, A.B.C., R.J. Souza, L.T. Braz & M. Tavares (2000) *Ciência Rural (Santa Maria)* **30**: 171-5
2. São José, A.B., I.V.B. Souza, D.O. Lírio, A.S. Vilarés, T.N.H. Rebouças & O.M. Morais (1992) *Rev. Bras. Cor. Nat.* **1**: 25-30
3. Pinheiro, A. L. & E.C. Almeida (1992) *Rev. Bras. Cor. Nat.* **1**: 31-5
4. Carvalho, P.R.N. (1992) *Rev. Bras. Cor. Nat.* **1**: 244-5
5. Mascarenhas, J.M.O. (1998) "*Corantes em alimentos: Perspectivas, usos e restrições*". Tese MS, Viçosa, UFV, 150p
6. Yabiku, H.Y., Y.M. Tkahashi & F.S.M. Caruso (1992) *Rev. Inst. Adolf. Lutz.* **1**: 11-8
7. Harbone, J. B. (1974) *Phytochemistry* **14**: 1331-7
8. Markaveritch, B.M., R.R. Roberts, M.D. Alejandro, G.A. Johson & J.H. Clark (1988) *J. Steroid Biochem.* **30**: 71-8
9. Ranelletti, F.Ø., R. Ricci, L.M. Larocca, N. Maginao, A. Capelli, G. Scambia, P.B. Panini, S. Mancuso, C. Rumi & M. Pianelli (1992) *Int. J. Cancer* **50**: 486-92
10. Kandaswami, C.E., D.S. Perkins, S. Soloniuk, G. Drzewiecki & E.J. Middleton (1993) *Anti-cancer Drugs* **4**: 91-6
11. Varma, S. (1986) *Inhibition of Aldose reductase by flavonoids. Possible attenuation of diabetic complications*. In: (V.M. Cody & J.B. Harborne, eds.). New York: Alan R. Liss Inc., pags. 343-58
12. Fourie, T.G. & F.O.A. Snyckers (1984) *J. Nat. Prod.* **47**: 1057
13. Selway, J. W. T (1986) "*Antiviral activity of flavones and flavans. Plant Flavonoids in Biology and Medicine*". New York: Alan R. Liss Inc, págs. 521-36
14. Goker, H., M. Tuncbilek, G. Leoncini, E. Buzzi, M. Mazzei, Y. Rolland & R. Ertan (1995) *Drug Res.* **45**: 2-5
15. Kellis, J.T. & L.E. Vickery (1984) *Science* **225**: 1032-4
16. Schramm, D.D., G. Bruckner & G.A. Boissonneault (1996) *Faseb J.* **10** (Abstract: A 461)
17. Schramm, D.D., G. Bruckner & G.A. Boissonneault (1995) *Faseb J.* **9**: (Abstract: A 153)
18. Schramm, D.D. & B.J.J. German (1998) *Nutr. Biochem.* **9**: 560-6
19. Lima, L.R.P., T.T. Oliveira, M.G.A. Oliveira, T.J. Nagem, A.S. Pinto, S.M. Gomes & J.T.S. Filho (1999) *Ciênc. Agrotec. Lavras* **23**: 626-31