

Toxicidade Aguda de Rutina e Bixina de *Bixa orellana*

Leonardo R. P. LIMA¹, Tania T. OLIVEIRA¹, Tanus J. NAGEM^{2*},
Aloisio S. PINTO³, Ednaldo Q. LIMA¹, & José F. SILVA⁴.

¹ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular,

Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

² Depto de Química da Univ. Federal de Ouro Preto, 35400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

³ Depto. de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

⁴ Depto. de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO. As substâncias rutina e bixina foram escolhidas para estudo uma vez que nosso laboratório de pesquisas busca efeitos farmacológicos de flavonóides e corantes naturais em várias plantas brasileiras. Foram avaliadas a toxicidade aguda de bixina e rutina na dose diária de 0,01 mol/Kg em coelhos hiperlipidêmicos induzidos por colesterol a 0,5% e ácido cólico a 0,1%, durante vinte e oito dias, após os quais foram dosadas uréia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais, cálcio, transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP). Os resultados evidenciaram que bixina e rutina reduziram os níveis desses parâmetros que permitem avaliar as alterações no metabolismo de aminoácidos, proteínas, dos ácidos nucleicos e mineral, ficando demonstrado a inocuidade da bixina e da rutina.

SUMMARY. "Acute toxicity of rutin and bixin of *Bixa orellana*". This work evaluates the acute toxicity of bixin and rutin in the daily dosis of 0.01 mol/kg in hyperlipidaemics rabbits induced by cholesterol at 0.5% and colic acid at 0.1%, during twenty-eight days, after which serum urea, creatinin, uric acid, total protein, calcium, glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT), were assessed in the blood. Bixin and rutin decreasead the concentrations of these substance wich indicators of disturbance in the amino acids, proteins, nucleic acid and mineral metabolisms; therefore demonstrating the innocuity of bixin and rutin.

INTRODUÇÃO

A toxicidade aguda envolve ensaios biológicos com animais experimentais, sendo uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de uma substância, fornecendo informações acerca dos riscos para a saúde, resultantes de uma exposição de curta duração de uma dose simples ou de doses repetidas, em períodos de 14 a 28 dias, por uma via selecionada¹. Nestes estudos, deve-se realizar exames hematológicos, bioquímicos, autópsia geral, histopatologia, efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos. Um grupo controle de animais para fins de comparação deve ser mantido e, durante o experimento, avaliar o estado geral dos animais, além de verificar a quantidade média de alimento consumido, sobrevivência dos animais,

o tempo transcorrido até a morte de 50% dos mesmos, além da observação dos efeitos tóxicos².

Substâncias de origem natural como os carotenóides, dentre eles, a bixina, derivada do urucum, e também o alfa-caroteno e beta-caroteno (cenoura), licopeno (tomate) e criptoxantina, luteína, e zeaxantina (brócolis) têm sido testados quanto à sua toxicidade. Verificou-se que estes compostos podem possuir a capacidade de prevenir o câncer³.

Flavonóides, como rutina, estão presentes em vegetais como alho, soja, frutas, vinho, tomate e chocolate, dentre outros. Muitos flavonóides são potentes antioxidantes, estão envolvidos na função imune, expressão de genes, fluxo sanguíneo cerebral e capilar, funções hepáticas, a atividade de enzimática, antiagregador

PALAVRAS-CHAVE: Toxicidade, Bixina, Rutina.

KEY WORDS: Toxicity, Bixin, Rutin.

* Autor a quem correspondência deverá ser enviada. E-mail: tjnagem.bh@zaz.com.br

plaquetário, síntese do colágeno, degradação de fosfolípidos, colesterol e metabolismo da histamina ⁴.

Nagem *et al.* ⁵ verificaram o efeito hipolipidêmico do flavonóide naringina e dos corantes naturais antocianina e carmin no metabolismo lipídico em ratos. Também, em estudos de Pereira *et al.* ⁶ foi observado um efeito pronunciado na redução de colesterol e triacilgliceróis, utilizando o flavonóide biochanina A e os corantes monascus e clorofila,

Efeitos de flavonóides sobre a peroxidação lipídica hepática de ratos tem sido alvo de pesquisas ⁷.

O composto bis (2-cloroetil)sulfeto (SM), um potente agente anti-micótico e também mutagênico e carcinogênico, quando aplicado em ratos, causou depleção de glutatión (GSH) e aumentou a peroxidação lipídica no fígado. Os flavonóides gossypina e hidroxietilrutósídeo foram capazes de aumentar os níveis de GSH e proteger da peroxidação lipídica, que foi medida pelos níveis de malonaldeído, que não sofreu alteração nos animais tratados.

Lavier *et al.* ⁸ avaliaram os efeitos de flavonóides sobre as enzimas metabolizadoras de drogas em fígado de ratos. A adição de flavonóides (flavona e tangerentina) à dieta, durante 2 semanas, aumentou as atividades mediadas pelo citocromo P-450 e b-5, como também as atividades do p-nitrofenil UDP-glicuronil transferase e glutatión transferase. Flavona e flavanona também aumentam o nível de fenol-UGT (UDP-Glicuronil transferase), androsterona e testosterona-UGTs. Esta ação biológica dos flavonóides é de suma importância, pois os complexos multienzimáticos Cit-P-450 e b5 são os responsáveis pelos fenômenos de detoxicação no fígado de animais.

Um estudo recente demonstrou a capacidade da rutina em reduzir, significativamente, os níveis de colesterol e triacilgliceróis, além de manter os níveis elevados de colesterol-HDL, em soro de ratos Wistar, hiperlipidêmicos, tratados previamente com triton ⁹. A bixina, por outro lado, também tem mostrado exercer efeito hipolipidêmico em coelhos tratados com triton ¹⁰.

A bixina e outros carotenóides possuem efeito antioxidante, sendo de importância na prevenção da aterosclerose. Sabe-se que a lipoproteína LDL, quando oxidada, danifica o endotélio, por conseguinte, a ação antioxidante dos carotenóides, nos quais se inclui a bixina e a norbixina, protegeria o endotélio da ação desta lipoproteína. As lesões ateroscleróticas iniciam-se

após algum tipo de injúria ao endotélio normalmente causada pelo LDL oxidado. Os carotenóides são captados neste processo e impedem esta oxidação ^{11, 12}.

Rutina e outros flavonóides tem sido pesquisados por seus efeitos sobre a atividade de hormônios esteroidais. Alguns flavonóides testados possuem atividade estrogênica, androgênica e progesteronal. Nesses estudos foram sugeridos que os flavonóides pesquisados podem ter efeitos na modificação dos riscos de câncer e na terapêutica e prevenção ¹³.

Também as pesquisas com flavonóides como a rutina, morina e outros com ação de interferência no metabolismo oxidativo do ácido araquidônico por plaquetas humanas e leucócitos e neutrófilos mostram o seu mecanismo de ação como antiinflamatórios por inibir as enzimas de dessa rota ¹⁴.

Considerando que essas substâncias possam no futuro, servir como medicamentos no controle do metabolismo lipídico, testes toxicológicos fazem-se necessários. O presente trabalho foi realizado para avaliar se ocorreu a toxicidade aguda por doses repetidas, durante 28 dias, do corante natural bixina e do flavonóide rutina de *Bixa orellana*, em coelhos hiperlipidêmicos tratados, diariamente, com colesterol e ácido cólico, por via oral.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados coelhos da raça Nova Zelândia, com peso médio variando de 1550 ± 100g, com idade de oito semanas, a 2200 ± 100, após atingir doze semanas de idade. Eles receberam a ração comercial Nutricóelhos, na proporção de 100 gramas diárias, e água à vontade.

Os coelhos foram separados em 5 grupos de 6 animais, distribuídos ao acaso, recebendo as substâncias bixina (corante natural) e rutina (flavonóide), conforme descrição: Grupo 1- Ração; Grupo 2- Ração + colesterol + ácido cólico; Grupo 3- Ração + colesterol + ácido cólico + bixina; Grupo 4- Ração + colesterol + ácido cólico + rutina; Grupo 5- Ração + colesterol + ácido cólico + bixina + rutina.

A hiperlipidemia foi induzida, administrando, por via oral, misturadas na ração, colesterol à 0,5% e ácido cólico à 0,1% de peso da ração, diariamente.

As substâncias testes foram fornecidas na dose de 0,01 mol/Kg de peso corporal, também por via oral, em cápsulas, utilizando o talco como veículo. Os animais do Grupo 1 e 2 também

receberam as mesmas cápsulas, porém sem as substâncias testes.

Após 28 dias de tratamento, amostras de sangue dos animais foram coletadas na veia da orelha de coelhos. Em seguida, foram centrifugadas à 7100 G, durante 15 minutos, para obtenção do soro. As dosagens sorológicas foram efetuadas e obtidos os valores em mg/dL de uréia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais, cálcio, transaminase glutâmico oxalacético (TGO) e transaminase glutâmico pirúvico (TGP), utilizando-se kits da marca Biolab e o equipamento Alizé (analisador automático de Bioquímica).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Tabelas 1 a 3, estão representados as médias e as percentagens de variação relativas aos níveis de uréia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais, cálcio e as enzimas TGO e TGP, respectivamente, avaliadas no soro dos coelhos hiperlipidêmicos, que receberam as substâncias bixina e rutina, isoladas e associadas, após 28 dias de tratamento, comparando-as com os níveis dos grupos controles G1- (Ração) e G2- (Ração + colesterol + ácido cólico).

Na Tabela 1, observa-se que o tratamento com rutina foi o que apresentou maior percentagem de redução (8,14%) de uréia e o tratamento com rutina + bixina, apenas aumentou 0,15% nos níveis de uréia. Em mamíferos, pela desaminação dos aminoácidos, há liberação de

amônia que, pelo ciclo da uréia no fígado, é convertida em uréia, constituindo-se na principal forma de excreção de nitrogênio. Já no coelho, há uma grande população de microorganismos no intestino grosso com atividade proteolítica e que utiliza o amoníaco e a uréia como fonte de nitrogênio. No ceco, se segrega uréia procedente do sangue, o que pode ajudar a manter um adequado aporte de nitrogênio para o metabolismo bacteriano¹⁵. Muitos flavonóides podem se ligar a proteínas afetando a sua absorção e o seu aproveitamento pelos animais. Considerando que a uréia é uma forma de excreção de nitrogênio em mamíferos a hidrólise diminuída de proteínas também afeta os níveis de uréia. Possivelmente esta seja uma das explicações. Quando o rim do animal também é afetado esses parâmetros são alterados de forma considerável. Esse estudo demonstrou que nas doses testadas as alterações foram pequenas.

Na Tabela 1, observa-se ainda que o grupo 3, tratado com bixina, reduziu em 12,88% o nível de creatinina, se comparado com o grupo 2, sendo esta redução estatisticamente significativa, enquanto a rutina não causou modificação significativa. A creatinina é formada nos animais à partir da arginina. Pode acumular-se no músculo e é reservatório de grupos fosfatos. Seus níveis são alterados, principalmente, em insuficiência renal e obstrução urinária¹⁶. Novamente nota-se que tanto a bixina quanto a rutina afetaram pouco este parâmetro. Isto vem demonstrar que

Grupos	Uréia (mg/dL)	% de variação em relação a: Ração	% de variação em relação a: Ração + CAC	Creatinina (mg/dL)	% de variação em relação a: Ração	% de variação em relação a: Ração + CAC
1- Ração (R)	38,60 ± 1,55			1,17 ± 0,05		
2- R + colesterol + ácido cólico (CAC)	27,03 ± 1,06	-29,07 #		1,32 ± 0,06		
3- R + CAC + bixina	26,70 ± 1,54 a	-30,83 *	-1,22	1,15 ± 0,08 a	-1,71#	-12,88 *
4- R + CAC + rutina	24,83 ± 1,21 a	-35,67 *	-8,14	1,27 ± 0,05 a	8,55	-3,79
5- R + CAC + rutina + bixina	27,07 ± 1,36 a	-29,87 *	+0,15	1,27 ± 0,08a	8,55	-3,79

Tabela 1. Valores médios de uréia e creatinina (± erro-padrão) e suas respectivas % de variação no soro sanguíneo de coelhos hiperlipidêmicos, tratados com bixina e/ou rutina. 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 Dunnett = 3,52 mg/dL. para uréia, DMS Dunnett = 3,52 mg/dL. para creatinina. # Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo teste F (P<0,05).

os resultados obtidos indicam que o rim não foi afetado por essas substâncias nas doses e vias utilizadas nesse estudo.

Analisando a Tabela 2, observa-se que os tratamentos não diferiram significativamente entre si. O grupo tratado com rotina obteve um aumento significativo no nível de ácido úrico, quando comparado com o grupo 1 (Ração), sendo a variação de 54,79%. Quando comparado com o grupo 2 (Ração + CAC), verifica-se que os tratamentos não causaram variação significativa, embora tenha ocorrido diminuição considerável nos níveis de ácido úrico nos grupos tratados com bixina (17,92) e bixina + rotina (29,25%). O ácido úrico nos animais é obtido por transformações sobre base purina contida nos ácidos nucléicos. As bases guaninas, pelo ação da guanase, fornecem a xantina e a adenina fornece a hipoxantina. Tanto a xantina, quanto a hipoxantina, produzem o ácido úrico, em presença da xantinaoxidase ¹⁷.

Possivelmente, a redução pode ter ocorrido por inibição da xantinaoxidase, o que seria importante nos tratamentos de pacientes com o nível de ácido úrico elevado como na gota, leucemia, anemia hemolítica, mieloma múltipla, entre outras.

Pesquisas tem revelado os efeitos de flavonóides inibindo a xantinaoxidase, portanto esses resultados podem ser explicados em parte por esse mecanismo de ação. No entanto a literatura não tem demonstrado efeitos de carotenóides sobre xantinaoxidase no entanto de acordo com os resultados obtidos houve uma redução de 17,92% que durante um mês é uma variação considerável. Normalmente indivíduos com gota ingerem medicamentos por longos períodos ou pelo menos enquanto durar a crise. O uso de antiinflamatórios nesse processo é comum e o consumo por longos períodos podem causar diversos efeitos colaterais.

Na Tabela 2, os valores de proteínas totais mostram que os tratamentos não apresentaram alteração significativa em relação aos grupos controles, G1- (Ração) e G2- (Ração + CAC). Estes resultados se mostram importantes, pois, a síntese protéica é elevada no fígado e, caso este órgão fosse afetado por estas substâncias, os níveis de proteínas iriam reduzir consideravelmente.

A proteína é o principal componente do tecido muscular, dos hormônios e das enzimas. Além disso, os anticorpos, elementos de defesa orgânica do animal contra doenças, são proteínas. Devido a essas funções no organismo ani-

mal a deficiência em proteínas provoca crescimento retardado, redução na eficiência de utilização dos alimentos, queda na resistência a doenças. O coelho necessita, principalmente, de dois aminoácidos presentes nas proteínas, metionina e lisina ¹⁸.

Além dos efeitos de inocuidade de bixina obtidos em nossos resultados a literatura relata que os carotenóides além de sua função como precursores de vitamina A, se tem atribuído aos carotenóides outras atividades biológicas, tais como o aumento da comunicação entre as uniões Gap, estimulação do sistema imunológico e atividade antioxidante ¹⁴. Essas propriedades específicas dos carotenóides tem sido discutidas no contexto de sua atividade preventiva contra o câncer.

De acordo com a Tabela 3, não se observa variação estatisticamente significativa nos níveis de cálcio entre os grupos tratados com os compostos e os grupos controles (G1 e G2). O cálcio exerce várias funções no organismo, como a participação do metabolismo ósseo, influi no transporte das membranas celulares, afeta a transferência dos íons através das organelas, facilita na liberação dos neurotransmissores, atua na liberação e ativação de enzimas, entre outras. Os seus níveis são alterados principalmente no hiperparatireoidismo, hipervitaminose D, transplantes de rins, neoplasias, pelo uso de diuréticos, síndrome nefrótica e pancreatite aguda ¹⁹.

De acordo com a Tabela 3, observa-se que os animais do grupo 2 aumentaram o teor de TGO no soro sanguíneo em 125,16% em relação ao grupo 1, sendo este aumento significativo pelo teste F. Embora os níveis de TGO no sangue dos animais tratados com bixina tenham se mantidos 30,10% mais elevados em relação aos animais do G1 (ração), esse tratamento foi capaz de reduzir de maneira significativa estes níveis, em comparação com o G2 (ração + CAC), cuja variação foi de 42,22%. Mais interessante foram os resultados obtidos com os tratamentos rotina (G4) e bixina + rotina (G5) que reduziram o teor de TGO àquele encontrado no grupo de animais controles, que receberam apenas ração (G1), diminuindo em 56,45% e 55,01%, respectivamente, em relação ao G2 (ração + CAC).

As transaminases transferem o grupo NH₂ dos aminoácidos para os cetoácidos alfa. A TGO catalisa a reação do ácido oxaloacético + ácido glutâmico para produzir ácido (-cetoglutárico + ácido aspártico. Em humanos, os valores normais de TGO oscilam de 8 a 20 UI/mL. Nas he-

Grupos	Ácido úrico (mg/dL)	% de variación em relação a:	% de variación em relação a:	Proteínas Totais (mg/dL)	% de variación em relação a:	% de variación em relação
1- Ração (R)	0,73 ± 0,19	Ração	Ração + CAC	57,87 ± 1,19	Ração	Ração + CAC
2- R + colesterol + ácido cólico (CAC)	1,06 ± 0,06	45,21#		59,75 ± 1,52	3,25	
3- R + CAC + bixina	0,87 ± 0,13 a	19,18	-17,92	57,92 ± 0,98 ab	0,09	-3,06
4- R + CAC + rutina	1,13 ± 0,11 a	54,79 *	6,60	57,48 ± 0,32 ab	-0,67	-3,80
5- R + CAC + rutina + bixina	0,75 ± 0,11 a	2,74	-29,25	59,18 ± 0,84 b	2,26	-0,95

Tabela 2. Valores médios de ácido úrico e proteínas totais (± erro-padrão) e suas respectivas % de variação no soro sanguíneo de coelhos hiperlipidêmicos, tratados com bixina e/ou rutina. 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 Dunnett = 0,32 mg/dL, para ácido úrico. # Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo teste F (P<0,05)

Grupos	Cálcio (mg/dL)	% de variación	TGO (UD)	% de variación	TGP (UD)	% de variación	% de variación
1- Ração (R)	13,65 ± 0,39	Em relação a a ração	31,00 ± 3,79	Em relação a a ração	58,60 ± 7,99	Em relação a a ração	Em relação a ração + CAC
2- R + colesterol + ácido cólico (CAC)	13,77 ± 0,40	0,88	69,80 ± 5,74	125,16 #	65,97 ± 14,19	12,58	
3- R + CAC + bixina	13,95 ± 0,30 a	2,20	40,33 ± 14,78 a	30,10	36,00 ± 3,62 a	-38,57	-45,43*
4- R + CAC + rutina	14,57 ± 0,33 a	6,74	30,40 ± 2,15 a	-1,94	41,80 ± 9,22 a	-28,67	-36,64*
5- R + CAC + bixina + rutina	13,38 ± 0,31a	-1,98	31,40 ± 7,83	1,29	62,40 ± 9,63 a	6,48	-5,41

Tabela 3. Valores médios de cálcio, TGO e TGP (± erro-padrão) e suas respectivas % de variação no soro sanguíneo de coelhos hiperlipidêmicos, tratados com bixina e/ou rutina. 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). # Estatisticamente diferente do grupo-controle (ração) pelo teste F (P<0,05). DMS Dunnett = 23,73 mg/dL para TGO, DMS Dunnett = 24,04 mg/dL para TGP

patites infecciosas, hepatopatias crônicas, icterícias, enfarte do miocárdio, as concentrações de TGO elevam-se extremamente ¹⁶.

A Tabela 3 apresenta os níveis de TGP, onde vê-se que a bixina foi o tratamento que mais reduziu (45,43%) em relação ao G2 (ração + CAC), seguido do tratamento com a rutina, que reduziu 36,64%. Em humanos, esta enzima também é responsável por reações de transaminação, cujos valores variam de 5 a 15 UI/mL. Esta enzima se eleva nas hepatites e icterícias. Sua elevação ocorre em menor intensidade no enfarte do miocárdio ¹⁶.

Os resultados obtidos evidenciam que, pela análise dos constituintes sanguíneos de uréia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais, cálcio, TGO e TGP de coelhos hiperlipidêmicos, nas condições experimentais estabelecidas neste trabalho, as substâncias bixina e rutina, reduzem os níveis dos parâmetros elevados pela administração de colesterol e ácido cólico aos teores encontrados no grupo de animais controle, que receberam apenas ração. A determinação destes

parâmetros permitem avaliar se as substâncias testes provocam alteração no metabolismo de aminoácidos, proteínas, dos ácidos nucleicos e dos minerais. O teste de toxicidade aguda realizado no presente trabalho mostra que a bixina e rutina não apresentaram efeitos deletérios, considerando os parâmetros avaliados, demonstrando assim a inocuidade destes compostos. Os compostos testados apresentaram efeitos farmacológicos como hipolipidêmicos o que poderá permitir no futuro o uso dos mesmos como fármacos e a avaliação de sua inocuidade sobre os outros parâmetros bioquímicos poderá demonstrar os seus efeitos não tóxicos. Outros estudos ainda serão necessários dentro da avaliação toxicológica.

No entanto, é importante ressaltar que todas as conclusões devem ser retiradas sempre de comparações com os grupos de animais normais do próprio experimento uma vez, que formulações diferentes de dietas devem afetar os parâmetros sanguíneos em qualquer espécie animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brito, A.S. (1994) *Manual de ensaios toxicológicos in vivo*. Campinas: Unicamp, 122 p.
2. Shaw, I.C. & J. Chadwick (1998) *Principles of Environmental Toxicology*. London: Taylor & Francis Ltd, 216 p.
3. Prasad, K.N. & J. Edwards-Prasad. (1990) *J. Am. Coll. Nutr.* **9**: 28-34.
4. Delaquis, P. & G. Mazza. (1998) Functional vegetable products. In: MAZZA, G. *Functional foods: biochemical and processing aspects*. Lancaster, Pennsylvania: Technomic, Cap. 6. págs. 193-233.
5. Nagem, T. J., W.L. Pereira & T.T. Oliveira (1999) *Rev. Bras. Farm.* **80**: 25-28.
6. Pereira, W. L., T.T. Oliveira & T.J. Nagem (1999) *Rev. Bras. Cor. Nat.* **3**: 59-65.
7. Vijayarghavan, R., K. Sugendr n & S.C. Pant (1991) *Toxicology* **69**: 35-42.
8. Lavier, M.C.C., M.F. Vernevaut & M. Totis (1996) *Toxicology* **114**: 19-27.
9. Santos, K.F.R., T.T. Oliveira & T.J. Nagem (1999) *Pharmacol. Res.* **40**: 493-6.
10. Lima, L.R.P. (2000) *Efeito farmacológico, toxicológico e mecanismo de ação de flavonóides e corantes naturais no metabolismo lipídico em coelhos*. Tese MS, UFV. 121 p.
11. Fontana, J.D., S.V. Mendes, D.S. Persike, L.F. Peracetta & M. Passos (2000) *Ciência e Desenvolvimento* **13**: 4-45.
12. E Gorab, M.I., B.A. Underwood & J.D. Loerch (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **01 (6)**: 265-77.
13. Zand, R.S.R., D.J.A. Jenkins & E.P. Diamandis (2000) *Breast Cancer Res. Treatment.* **62**: 35-49.
14. Corvazier, E. & Maclouf, J. (1985) *Interference of some flavonoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs with oxidative metabolism of arachidonic acid by human platelets and neutrophils. Bioch. e Biophys. Acta* **835**: 315-321.
15. Cheeke, P.R. (1987) *Alimentacion y nutricion del conejo*. Orlando, Florida: Academic Press. 429 p.
16. Lima, A.O., J.B. Soares & J.B. Greco (1985) *Métodos de Laboratórios Aplicados à Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
17. Bacilla, M. (1980) *Bioquímica Veterinária*. São Paulo: J. M. Varela Livros.
18. Mello, H.V. & J.F. Silva (1988) *A criação de coelhos*. 2. Ed. São Paulo: Publicações Globo Rural.
19. Mahan L.K. & M.T. Arlin (1995) *Alimentos, nutrição e dietoterapia*. 8. ed. São Paulo: Roca.