



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA-UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HIPOLIPEMIANTE DA QUITOSANA E
ASSOCIAÇÕES EM ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS FASE II**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rozangela Curi Pedrosa

Coorientador: Prof. Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira

REGINALDO GEREMIAS

Florianópolis
2002

**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HIPOLIPEMIANTE DA
QUITOSANA E ASSOCIAÇÕES EM ENSAIOS PRÉ-
CLÍNICOS E CLÍNICOS FASE II”**

POR

REGINALDO GEREMIAS

**Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo Orientador e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores Doutores:**

Banca Examinadora:



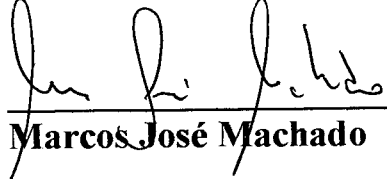
Rozangela Curi Pedrosa

(BQA/CCB/UFSC – Membro Titular)



Mauro César M. Laranjeira

(QMC/CFM – Membro Titular)



Marcos José Machado

(ACL/CCS/UFSC – Membro Titular)



**Prof.ª Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC**

Florianópolis, 20 de março de 2002.

Este trabalho é dedicado à Prof^a. Dr^a. Rozangela Curi Pedrosa, cuja sabedoria e amizade foram marcantes na minha formação pessoal, acadêmica e profissional.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a Dr^a Rozangela Curi Pedrosa, pelo dinamismo e competência com que desenvolve as suas atividades de ensino, pesquisa e orientação.

Ao Prof. Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira, pela maneira atenciosa e prestativa com que cumpriu o seu papel de coordenação e co-orientação do presente trabalho.

Ao Dr. Roberto Coury Pedrosa, pelo trabalho de coordenação, supervisão e orientação dos ensaios clínicos fase II.

Ao Prof. Dr. Marcos José Machado, cujos ensinamentos contribuíram significativamente para minha formação acadêmica e profissional.

Ao Prof. Dr. Valfredo Tadeu De Fávere, pela orientação junto às atividades de iniciação científica, bem como, pelas contribuições oferecidas no decorrer deste trabalho.

À Prof^a . Dr^a. Míriam Barcellos Falkenberg, pela dedicação junto à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC, bem como, a todos os professores do programa.

A todos os pacientes que se dispuseram a participar, voluntariamente, dos ensaios clínicos.

À Indústria Farmacêutica Santa Terezinha, na pessoa do Sr. Daniel Rocha, pelos trabalhos de produção e controle de qualidade das cápsulas de quitosana e associações.

Aos professores doutores Danilo Wilhelm Filho, Carlos Soares, Tânia Beatriz Creczynski Pasa e Rosendo Augusto Yunes, pelas orientações juntos às atividades de pesquisa.

Aos colegas de mestrado, de laboratório (Jean, “Tatianas”, Lorena, Graciela, Ana, Jussara), do grupo QUITTECH, de “república” e, em especial, à Claudriana, Luís Flávio e Sílvio, pelo convívio harmonioso.

Ao Departamento do Curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC–Criciúma/SC), pelo carinho com que me acolheram na Instituição.

Aos meus familiares, amigos e namorada, pelo incentivo e presença.

À coletividade que, através dos impostos, permitiram que eu frequentasse uma Universidade pública, gratuita, de qualidade e com compromisso social.

A Deus, que por ser pai, nos fez todos irmãos e responsáveis uns pelos outros.

“Ninguém tem maior amor do que aquele que dá a vida pelos seus amigos” (Jesus Cristo)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 COLESTEROL.....	1
1.1.1 Absorção e excreção do colesterol.....	2
1.1.2 Biossíntese do colesterol.....	3
1.1.3 Catabolismo do colesterol.....	6
1.2 LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....	7
1.3 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE COLESTEROL E DE LIPOPROTEÍNAS.....	9
1.4 HIPERLIPIDEMIAS E ATEROSCLEROSE.....	11
1.5 OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA HIPERLIPIDEMIAS.....	13
1.6 QUITOSANA E ASSOCIAÇÕES COMO ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA HIPERLIPIDEMIAS.....	16
1.6.1 Quitosana.....	16
1.6.2 Estudos do efeito hipolipemiante da quitosana em animais.....	17
1.6.3 Estudos clínicos com a quitosana.....	20
1.6.4 Associação quitosana/ <i>Brassica olearaceae</i>	22
1.6.5 Associação quitosana/ <i>Aloe vera</i>	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 OBTENÇÃO DA QUITOSANA HIDROSSOLÚVEL, LACTOSE, <i>Aloe vera</i> E <i>Brassica olearaceae</i>	28
3.2 PREPARAÇÃO DAS ASSOCIAÇÕES.....	30

3.3 CONTROLE DE QUALIDADE DA QUITOSANA HIDROSSOLÚVEL E ASSOCIAÇÕES.....	30
3.4 ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS EM RATOS.....	31
3.4.1 Animais.....	31
3.4.2 Tratamento dos animais.....	31
3.4.3 Determinação dos parâmetros bioquímicos, parâmetros nutricionais e ponderais.....	31
3.5 ENSAIOS CLÍNICOS FASE II.....	32
3.5.1 Tipo de estudo.....	32
3.5.2 Considerações éticas.....	32
3.5.3 Pacientes.....	32
3.5.4 Tratamento.....	33
3.5.5 Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	34
3.6 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	34
3.6.1 Colesterol total.....	34
3.6.2 HDL-colesterol.....	34
3.6.3 LDL-colesterol e VLDL-colesterol.....	34
3.6.4 Triglicerídeos.....	35
3.6.5 Glicose.....	35
3.6.6 Fosfatase Alcalina.....	35
3.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICOS DOS DADOS.....	35
4 RESULTADOS.....	36
4.1 CONTROLE DE QUALIDADE DA QUITOSANA HIDROSSOLÚVEL E ASSOCIAÇÕES.....	36
4.1.1 Análise química da quitosana hidrossolúvel e peso das cápsulas.....	36
4.1.2 Análise microbiológica da quitosana hidrossolúvel e associações.....	37
4.2 ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS COM RATOS.....	37
4.2.1 Consumo de água e ração.....	37
4.2.2 Ganho de peso.....	38
4.2.3 Peso, aspectos anatômicos e patológico dos órgãos.....	39
4.2.4 Níveis séricos de glicose.....	39
4.2.5 Atividade da fosfatase alcalina.....	41
4.2.6 Níveis séricos de colesterol total.....	43

4.2.7 Níveis séricos de HDL-colesterol.....	45
4.2.8 Concentrações calculadas de LDL-colesterol e VLDL-colesterol.....	46
4.2.9 Níveis séricos de triglicerídeos.....	50
4.3 ENSAIOS CLÍNICOS FASE II.....	51
4.3.1 Características da amostragem.....	51
4.3.2 Níveis séricos de glicose.....	53
4.3.3 Atividade da fosfatase alcalina.....	53
4.3.4 Níveis séricos de colesterol total.....	54
4.3.5 Níveis séricos de HDL-colesterol.....	56
4.3.6 Concentrações calculadas de LDL-colesterol e VLDL-colesterol.....	57
4.3.7 Níveis séricos de triglicerídeos.....	59
5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÕES.....	73
7 PERSPECTIVAS.....	75
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
9 ANEXOS.....	90
ANEXO 1. Critérios de inclusão/exclusão do protocolo clínico.....	90
ANEXO 2. Formulário de identificação dos pacientes.....	92
ANEXO 3. Consentimento livre e esclarecido.....	99
ANEXO 4. Resultados da análise microbiológica da quitosana hidrossolúvel e associações.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a. Estrutura química do colesterol.....	2
Figura 1b. Biossíntese do colesterol.....	5
Figura 2a. Estrutura das lipoproteínas plasmáticas.....	8
Figura 2b. Metabolismo das lipoproteínas plasmáticas.....	9
Figura 3. Placa aterosclerótica.....	13
Figura 4. Obtenção da quitosana hidrossolúvel.....	29
Figura 5. Ganho de peso em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias.....	38
Figura 6a. Análise comparativa dos níveis séricos de glicose em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao controle.....	40
Figura 6b. Análise comparativa dos níveis séricos de glicose em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao início do tratamento.....	41
Figura 7a. Análise comparativa da atividade da fosfatase alcalina em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao controle.....	42
Figura 7b. Análise comparativa da atividade da fosfatase alcalina em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao início do tratamento.....	43
Figura 8a. Análise comparativa dos níveis séricos de colesterol total em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao controle.....	44
Figura 8b. Análise comparativa dos níveis séricos de colesterol total em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao início do tratamento.....	44
Figura 9a. Análise comparativa dos níveis séricos de HDL-colesterol em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao controle.....	45
Figura 9b. Análise comparativa dos níveis séricos de HDL-colesterol em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao início do tratamento.....	46
Figura 10a. Análise comparativa dos níveis séricos de LDL-colesterol em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao controle.....	47

Figura 10b. Análise comparativa dos níveis séricos de LDL-colesterol em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao início do tratamento.....	48
Figura 11a. Análise comparativa dos níveis séricos de VLDL-colesterol em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao controle.....	49
Figura 11b. Análise comparativa dos níveis séricos de VLDL-colesterol em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao início do tratamento.....	49
Figura 12a. Análise comparativa dos níveis séricos de triglicerídeos em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao controle.....	50
Figura 12b. Análise comparativa dos níveis séricos de triglicerídeos em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao início do tratamento.....	51
Figura 13. Análise comparativa da atividade da fosfatase alcalina em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias em relação ao início do tratamento.....	54
Figura 14a. Análise comparativa dos níveis séricos de colesterol total em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias em relação ao placebo.....	55
Figura 14b. Análise comparativa dos níveis séricos de colesterol total em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias em relação ao início do tratamento.....	56
Figura 15a. Análise comparativa dos níveis séricos de LDL-colesterol em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias em relação ao placebo.....	58
Figura 15b. Análise comparativa dos níveis séricos de LDL-colesterol em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias em relação ao início do tratamento.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis de colesterol total e colesterol das LDL associados a riscos de incidência de coronariopatia, de acordo com o NCEP.....	10
Tabela 2. Correlação entre os níveis de colesterol total e colesterol das HDLs associados a riscos de incidência de coronariopatia, de acordo com o estudo de <i>Framingham</i>	10
Tabela 3. Valores de referência do perfil lipêmico recomendados pela Sociedade Brasileira de Cardiologia.....	11
Tabela 4. Análise química da quitosana hidrossolúvel.....	36
Tabela 5. Peso das cápsulas (mg/dl) de quitosana hidrossolúvel e associações..	36
Tabela 6. Consumo de água (ml) em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias	37
Tabela 7. Consumo de ração (g) em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias.....	38
Tabela 8. Peso dos órgãos (g) em ratos submetidos a diferentes tratamentos após 95 dias	39
Tabela 9. Número de pacientes submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias e percentual de desistência ao final do tratamento.....	51
Tabela 10. Número de desistências aos diferentes tratamentos e respectivas justificativas.....	52
Tabela 11. Dados dos pacientes submetidos aos diferentes tratamentos durante 30 e 60 dias.....	53
Tabela 12. Níveis séricos de glicose (mg/dl) em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias.....	53
Tabela 13. Níveis séricos de HDL-colesterol (mg/dl) em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias.....	57
Tabela 14. Níveis séricos de VLDL-colesterol (mg/dl) em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias	59
Tabela 15. Níveis séricos de triglicerídeos (mg/dl) em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA: Acetil coenzima A
ATP: Adenosina trifosfato
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
DPP: 3,3-dimetilalil pirofosfato
DMIND: *Diabetes mellitus* Insulino não Dependente
FPP: Farnesil pirofosfato
GPP: Geranyl pirofosfato
HDL: Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA redutase: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase
HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HPLC: Cromatografia líquida de alta precisão
HUCFF: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IDL: Lipoproteína de densidade intermediária
IPP: Isopentil pirofosfato
LCAT: Lecitina-colesterol aciltransferase
LDL: Lipoproteína de baixa densidade
NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, forma reduzida
NCEP: Expert Panel National Cholesterol Education Program
Oxi-LDL: LDL, forma oxidada
QUITECH: Grupo de pesquisa em quitina e aplicações tecnológicas
UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina
TBARS: Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade
UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

LISTA DE SÍMBOLOS

CO₂: Dióxido de carbono
HCl: Ácido clorídrico
H₂O: água
KOH: Hidróxido de potássio
NaOH: Hidróxido de sódio

RESUMO

Elevados níveis plasmáticos de lipídeos tem sido associados a um aumento do risco de incidência de aterosclerose, sendo que ainda são poucas as opções terapêuticas para a prevenção e/ou tratamento desta doença. Neste sentido, o presente trabalho se propôs avaliar o efeito hipolipemiante da quitosana e associações a serem utilizadas como alternativas terapêuticas para hiperlipidemias. Para tanto, foram realizados ensaios pré-clínicos em ratos e clínicos fase II em humanos, os quais foram submetidos a diferentes tratamentos com quitosana, quitosana associada à *Aloe vera* e quitosana associada à *Brassica olearaceae*, com vistas a identificar as formulações mais efetivas em termos de potencial hipolipemiante. Os resultados obtidos nos ensaios pré-clínicos em ratos demonstram que tratamento com quitosana associada à *Brassica olearaceae* foi o mais efetivo, uma vez que foi capaz de provocar uma redução significativa nos níveis séricos de colesterol total, LDL-colesterol, VLDL-colesterol e triglicédeos. Por sua vez, os resultados obtidos nos ensaios clínicos fase II em humanos demonstram que o tratamento com quitosana associada à *Aloe vera* foi o mais efetivo, sendo capaz de reduzir, significativamente, os níveis de colesterol total e LDL-colesterol. Os resultados obtidos sugerem que as associações quitosana/*Brassica olearaceae* e quitosana/*Aloe vera* se mostram como alternativas terapêuticas para quadros de hiperlipidemias, contribuindo, desta forma, para a prevenção e/ou tratamento de processos aterogênicos.

ABSTRACT

High levels of serum lipids are associated with the risk of atherosclerosis, and there are still few therapeutic interventions for the treatment of this disease. In this regard the goal of the present study was to evaluate the hypolipemic effect of chitosan and associations that have potential use as alternative therapies. Preclinical assays were used in rats and phase II clinical assays in human subjects, which were submitted to different treatments with chitosan, chitosan associated with *Aloe vera*, and chitosan associated with *Brassica oleracea*, aiming to identify the formulae which are more effective hypolipemic potential. The results obtained in the preclinical assays in rats showed that the treatment with chitosan associated with *Brassica oleracea* was more efficient, because it was able to decrease the serum levels of total cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol and triglycerides. In turn, the results obtained in the phase II clinical assays in humans showed that the treatment with chitosan associated with *Aloe vera* was the more effective, being able to decrease the levels of cholesterol and LDL-cholesterol. In all, the results suggested that the association of chitosan/*Brassica oleracea* and chitosan/*Aloe vera* are therapeutic alternatives regarding hyperlipidemia, and, in such way, contribute for the prevention and/or treatment of atherogenic processes.

1 INTRODUÇÃO

As enfermidades do coração, sobretudo aquelas denominadas de enfermidades cardíacas degenerativas, estão associadas à elevação dos níveis plasmáticos de lipídeos e, em geral, não tem cura; são graves e incapacitantes na sua fase final, levando à diminuição da qualidade e do tempo de vida (NEVES, 1997; NISHINO, 2000).

O principal processo anatomopatológico que conduz a doenças cardiovasculares é a aterosclerose, condição que envolve lesão arterial, a qual pode provocar cardiopatia isquêmica, infarto do miocárdio e acidentes vasculares (LEESON, 2000; SZKLO, 2000).

Os dados epidemiológicos demonstram que a incidência destas doenças, em países ocidentais, é considerada elevada, atingindo particularmente homens e mulheres na faixa etária de 40 a 50 anos (BROWA, 2000).

Para se entender o papel da hiperlipidemia nas doenças cardiovasculares, em especial, na aterosclerose, faz-se necessário dar visibilidade ao pressupostos teóricos envolvidos no metabolismo do colesterol, dos ácidos e sais biliares e das lipoproteínas.

1.1 COLESTEROL

O colesterol é o principal esteroide presente nos tecidos humanos e realiza uma série de funções essenciais, podendo servir como componente estrutural das membranas celulares e das lipoproteínas, bem como, precursor da síntese de ácidos biliares, de hormônios esteróides e de vitamina D (MEYER & RICHTER, 2001; STRYER, 1995; BRENDDEL, 1999).

Sua estrutura química (figura 1a) consiste em quatro anéis fusionados (A, B, C, e D) com os carbonos numerados em seqüência e uma cadeia ramificada de hidrocarboneto de oito membros ligada ao anel D. A maior parte do colesterol plasmático está em forma esterificada, onde o grupo hidroxila do carbono 3 está ligado a um resíduo de ácido graxo através de uma ligação éster, tornando a estrutura ainda mais hidrofóbica (GREEVENBROEK & BRUIN, 1998). Devido a sua hidrofobicidade, o colesterol deve ser transportado, ou em associação a uma proteína como componente

de lipoproteína, ou solubilizado pelos fosfolipídeos e sais biliares na bile (DENNIS, 2000; LEHNINGER, 2000).

O colesterol pode ser proveniente da dieta, através da ingestão de alimentos de origem animal (ovos, laticínios, carnes, etc) ou sintetizados por, praticamente, todos os tecidos, sendo o fígado, intestino, córtex adrenal, ovários, testículos e placenta as principais fontes endógenas (PIGNONE, 2001; CHAMPE & HARVEY, 2000)

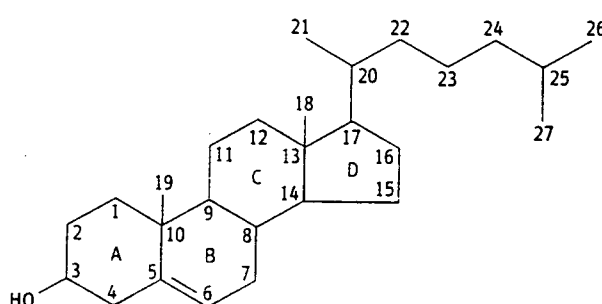


Figura 1a. Estrutura química do colesterol (BAYNES & DOMINICZAK, 2000)

1.1.1 Absorção e excreção do colesterol

Mamíferos superiores absorvem perfeitamente o colesterol proveniente da dieta, sendo que a dieta normal contém uma mistura de colesterol e colesteril ésteres (MONTGOMERY, 1994). O colesterol da dieta é incorporado em micelas que são formadas pelos constituintes anfipáticos da bile. Estas micelas contêm ácidos biliares conjugados e fosfolipídeos, além do colesterol (GREEVENBROEK & BRUIN, 1998). A emulsificação é necessária, uma vez que o colesterol é pouco solúvel no quimo (o meio aquoso presente no lúmen intestinal), devendo estar em um estado físico adequado à captação pela mucosa intestinal (MONTGOMERY, 1996). O colesterol esterificado é, então, hidrolisado no lúmen intestinal pela ação da colesteril esterase, uma enzima secretada no suco pancreático, sendo que a hidrólise ocorre na superfície ou no interior das micelas (GREEVENBROEK & BRUIN, 1998).

O colesterol é transferido das micelas para as células da mucosa intestinal por difusão passiva, onde a maior parte é subseqüentemente reconvertida em ésteres de colesterol. A absorção ocorre, principalmente, no jejuno inferior e no íleo. Os colesteril ésteres sintetizados nas células da mucosa, juntamente com o colesterol não esterificado, são incorporados aos quilomícrons, que transportam o colesterol e outros lipídeos da dieta para o plasma, através da linfa, via ducto torácico. Eventualmente, o colesterol é depositado nos tecidos, principalmente no fígado (PHAN & TSO, 2001).

A excreção do colesterol inalterado se dá nas fezes, sendo que o mesmo é liberado do fígado para o intestino, na bile, e que quantidades adicionais de colesterol são derivadas das células descamadas da mucosa intestinal. Uma parte do colesterol da dieta é excretada sem ter sido absorvida. Parte do colesterol, no intestino, sofre ação de enzimas das bactérias intestinais e é convertida em outros esteróis neutros, tais como, coprostanol, colestanona e colestestanol, antes de sua excreção nas fezes. A estrutura em anel do colesterol não pode ser metabolizada a CO_2 e H_2O . Assim, parte do anel esterol é convertida em ácidos biliares, os quais são excretados nas fezes ou são secretados na bile e transportados ao intestino para serem eliminados (ROS, 2000)

1.1.2 Biossíntese do colesterol

A biossíntese de colesterol (figura 1b) se dá a partir de acetil CoA, que pode ser derivada de carboidratos, de aminoácidos ou de ácidos graxos. No primeiro estágio, duas moléculas de acetil CoA condensam-se para formar acetoacetil CoA e, a seguir, uma terceira molécula de acetil CoA é adicionada, produzindo 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG CoA), a nível citoplasmático. O próximo passo é a síntese do mevalonato catalisada pela HMG CoA redutase no retículo endoplasmático, onde duas moléculas de NADPH participam como agentes redutores, provocando a liberação de CoA (TANSEY & SHECHTER, 2000). O mevalonato é, então, convertido em 5-pirofosfomevalonato em duas etapas, onde cada uma das quais transfere um grupo fosfato do ATP. Em seguida, uma unidade de isopreno de cinco carbonos, isopentenil pirofosfato (IPP), é formada por descarboxilação do 5-pirofosfomevalonato, mediada por ATP. O IPP é, então, isomerizado a 3,3-dimetilalil pirofosfato (DPP). O IPP e DPP condensam-se para formar o geranyl pirofosfato (GPP). Uma segunda molécula de IPP condensa-se com o GPP para formar o farnesil pirofosfato (FPP). Duas moléculas do farnesil pirofosfato

combinam-se, liberando pirofosfato e são reduzidas formando o esqualeno. O esqualeno é convertido em lanosterol por uma seqüência de reações envolvendo oxigênio molecular e NADPH (DENNIS, 2000). A conversão do lanosterol em colesterol é um processo de etapas múltiplas, resultando no encurtamento da cadeia, de 30 para 27 carbonos, na remoção dos dois grupos metila em C-4, na migração da ligação dupla de C-8 para C-5 e na redução da ligação dupla entre C-24 e C-25, sendo que todas as enzimas envolvidas nesta conversão estão localizadas no retículo endoplasmático (ROS, 2000).

A biossíntese do colesterol pode ser regulada por diferentes mecanismos. A regulação pode se dar por inibição retroativa (*feedback*), onde o colesterol atua como um inibidor da HMG-CoA redutase, enzima alostérica limitante da velocidade de biossíntese do esterol (STEINER, 2001). Alguns hormônios têm ações regulatórias sobre a biossíntese de colesterol no fígado, operando através de efeitos sobre a atividade da HMG-CoA redutase, provavelmente, controlando a produção da enzima ou provocando modificações covalentes por mecanismos de fosforilação e desfosforilação, tornando a enzima ativa ou inativa. O glucagon, por exemplo, favorece a produção da forma inativa (fosforilada) e, assim, diminui a velocidade de síntese de colesterol. A insulina, ao contrário, favorece a produção da forma ativa (desfosforilada) da enzima, resultando em um aumento na velocidade da síntese de colesterol (CHAMPE & HARVEY, 2000). A biossíntese do colesterol também pode se dar via regulação da transcrição do gene da HMG-CoA redutase, levando à estimulação da síntese de novo do colesterol (DENNIS, 2000).

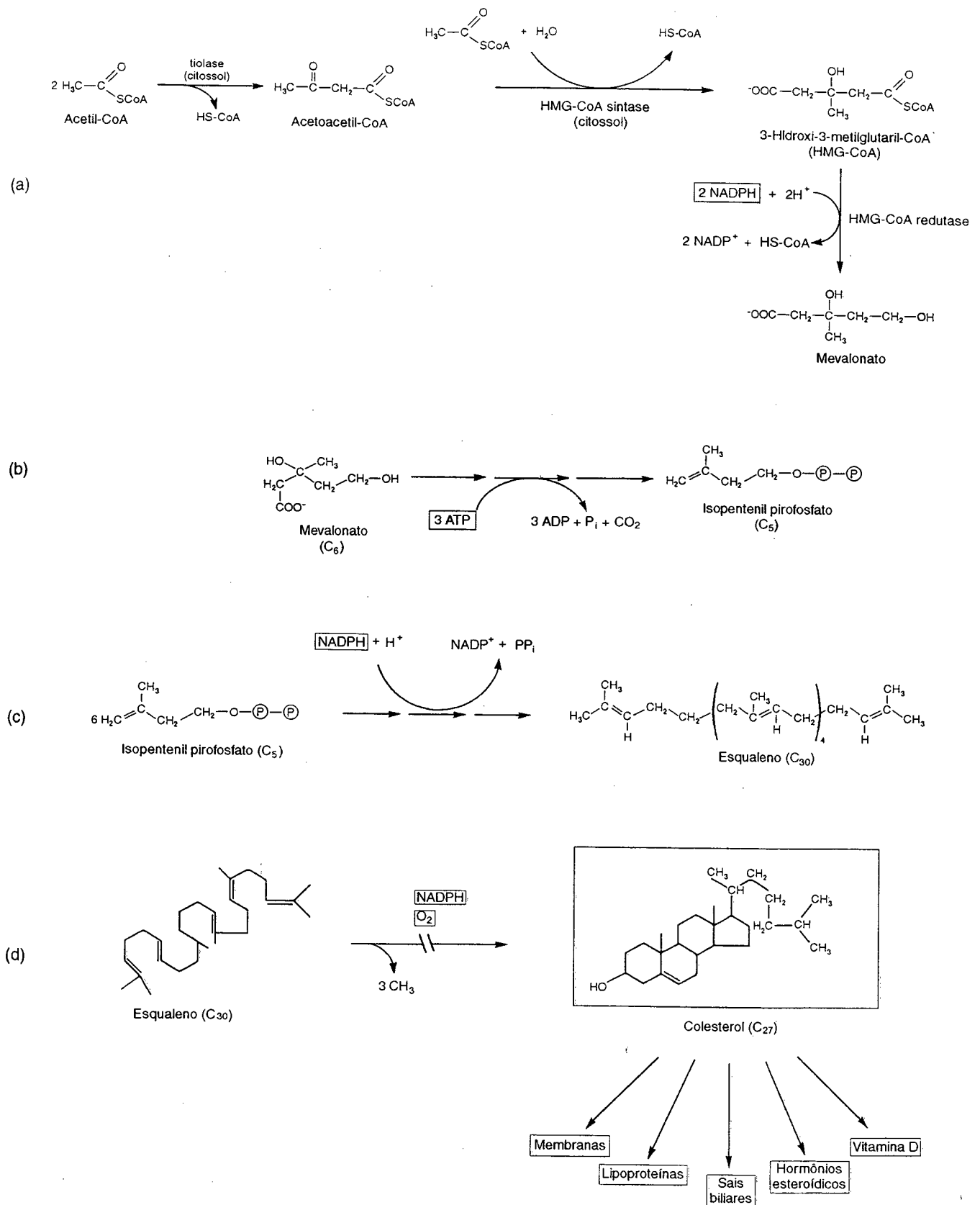


Figura 1b. Biossíntese do colesterol (MARZZOCO & TORRES, 1999)

1.1.3 Catabolismo do colesterol

Os ácidos biliares, produto primário do catabolismo do colesterol, são sintetizados no fígado, a partir deste esterol, por uma rota de etapas múltiplas, na qual os grupos hidroxila são inseridos em posições específicas na estrutura do esteróide, onde a ligação dupla do anel B do colesterol é reduzida e a cadeia de hidrocarboneto é encurtada em três carbonos, introduzindo um grupo carboxila na extremidade da cadeia, mediada pela 7 α redutase, enzima limitante da síntese (ROS, 2000).

Antes dos ácidos biliares deixarem o fígado, eles são conjugados a uma molécula de glicina ou taurina, gerando estruturas denominadas de sais biliares, os quais se incluem os ácidos glicocólico, glicodeoxicolico, taurocólico e taurodeoxicolico. Os sais biliares são detergentes mais efetivos que os ácidos biliares, devido sua natureza anfipática aumentada. As bactérias, no intestino, podem remover a glicina e taurina dos sais biliares, podendo também converter alguns ácidos biliares primários em secundários. Os sais biliares secretados no intestino são eficientemente reabsorvidos e reutilizados. A mistura de ácidos e sais biliares primários e secundários é absorvida principalmente no íleo por transporte ativo. Os mesmos são levados das células da mucosa intestinal ao sangue portal, sendo eficientemente removidos pelas células parenquimatosas do fígado. O fígado converte tanto os ácidos biliares primários como secundários em sais biliares, pela conjugação com glicina ou taurina, permitindo que sejam excretados na bile. A bile consiste em uma mistura aquosa de compostos orgânicos, sendo a fosfatidilcolina e os sais biliares os mais importantes, em termos quantitativos. Os ácidos biliares são moléculas anfipáticas, contendo uma face polar e uma apolar, podendo agir como agentes emulsificantes no intestino, auxiliando as enzimas digestivas pancreáticas na degradação dos lipídeos da dieta (LUIS, 2001).

O contínuo processo de secreção de sais biliares na bile, sua passagem através do duodeno, onde alguns são convertidos em ácidos biliares, e seu retorno subsequente ao fígado, como uma mistura de ácidos e sais biliares, é denominado de circulação entero-hepática (AGELLON & ENRIQUE, 2000).

Um dos fatores envolvidos na regulação da biossíntese de ácidos biliares é a quantidade de ácido biliar que retorna do intestino para o fígado. Assim, a biossíntese diminui na medida em que mais ácidos biliares são reabsorvidos e em que aumenta o

retorno de ácidos biliares para o fígado. A síntese de ácidos biliares também é regulada pela quantidade de colesterol que é transportado do intestino para o fígado, estando aumentada quando a absorção de colesterol se eleva (JOYCE & DAVID, 1999).

A produção de ácidos biliares é a via metabólica mais importante para a regulação dos níveis circulantes de colesterol do ponto de vista quantitativo, uma vez que a conversão contínua de colesterol em ácidos biliares no fígado evita o acúmulo dos mesmos nos tecidos.

1.2 LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

As lipoproteínas plasmáticas constituem uma família de partículas globulares compostas de um núcleo de lipídeo neutro (triglicerídeos ou éster de colesterol), revestido por uma camada de lipídeos polares (fosfolipídeos e colesterol) e apoproteínas (figura 2a). Podem ser divididas em cinco tipos: quilomícrons, que possuem a densidade mais baixa, sendo compostos primariamente de triglicerídeos, estando presentes no plasma após as refeições; lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), que, principalmente, transportam os triglicerídeos sintetizados no fígado; lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) que são resquílios gerados da ação da lipase lipoproteica sobre as VLDLs; lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL), que atuam, primariamente, no transporte do colesterol endógeno para as células teciduais (THOMAS, 2001)

O colesterol endógeno e exógeno é transportado pelas várias lipoproteínas, através de duas vias distintas: via endógena e via exógena (STANLEY & ROBBINS, 1991).

Na via exógena, os triglicerídeos e o colesterol da dieta são incorporados aos quilomícrons (contendo apoproteínas E, C11 e B48) nas células epiteliais intestinais; os quilomícrons alcançam os capilares periféricos, via vasos linfáticos intestinais, para serem hidrolisados pela lipase lipoproteica endotelial, liberando ácidos graxos no tecido adiposo e músculo. Os resquílios dos quilomícrons remanescentes, ricos em colesterol, são então absorvidos por pinocitose, mediada por receptores, e degradados nos lisossomos pelo fígado. Assim, os quilomícrons transportam o colesterol exógeno para o fígado, e os triglicerídeos para o tecido adiposo. Parte do colesterol no fígado é

excretada na forma de colesterol livre ou ácidos biliares para dentro do intestino (GREEVENBROEK & BRUIN, 1998).

Na via endógena, a VLDL contendo triglicerídeos e três apoproteínas (E, C e B100), é secretada pelo fígado e transportada para o tecido adiposo e músculo, onde ocorre uma seqüência de eventos que transforma a VLDL, via formação da IDL, em LDL. O núcleo da LDL é composto quase que exclusivamente de éster de colesterol e a camada externa de apenas uma apoproteína, a B100 (LISCUM & MUNN, 1999). Dois terços da LDL resultante são metabolizados pelas células hepáticas e outras células em tecidos extra-hepáticos (células adrenais, fibroblastos, células musculares lisas, células linfóides, células endoteliais) através de receptores da LDL. Essa via constitui o meio pelo qual as células não-hepáticas controlam o colesterol necessário para a síntese das membranas (GREEVENBROEK & BRUIN, 1998). Na presença de baixas concentrações de LDL extracelular, são elaborados mais receptores, e vice-versa. O receptor da LDL liga-se à apoproteína B e E. O terço restante da LDL é degradado por mecanismo independente do receptor de LDL, como as células do sistema fagocitário mononuclear e endocitose líquida e adsortiva não mediada por receptores em várias células. O colesterol não esterificado, oriundo da renovação normal das membranas celulares, é transportado pela HDL para o plasma. Através da ação da enzima plasmática lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), o colesterol da HDL é transferido à IDL e, eventualmente, à LDL (LISCUM & MUNN, 1999). O metabolismo das lipoproteínas está representado na figura 2b.

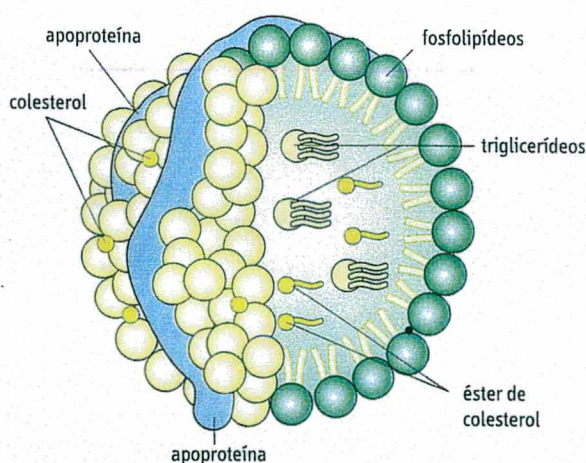


Figura 2a. Estrutura das lipoproteínas plasmáticas (BAYNES & DOMINICZAK, 2000)

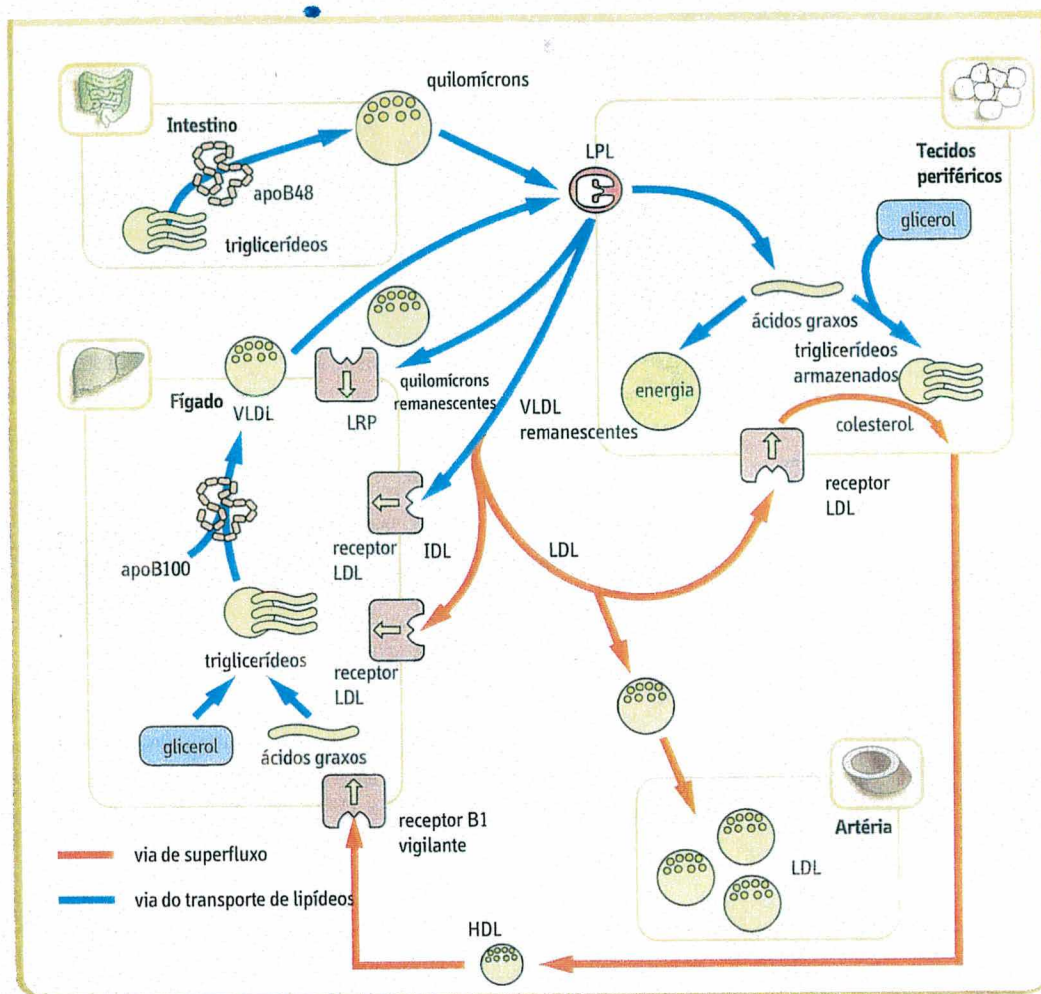


Figura 2b. Metabolismo das lipoproteínas plasmáticas (BAYNES & DOMINICZAK, 2000)

1.3 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE COLESTEROL E DE LIPOPROTEÍNAS

Estudos epidemiológicos sugerem que pessoas com concentrações plasmáticas de colesterol acima de 200mg/dl têm uma tendência aumentada de desenvolverem aterosclerose, sendo recomendada a adoção de dieta com baixo teor de colesterol para a redução dos níveis sanguíneos deste esteroide (GHANNEM, 2001).

Em geral, a concentração normal de colesterol no plasma, obtido de uma pessoa em jejum, se encontra entre 120 a 220mg/dl, sendo que em adultos jovens e saudáveis, o valor médio é de 175 mg/dl (MONTGOMERY, 1996).

Em muitos casos, a hipercolesterolemia têm uma forma relativamente branda, na qual a concentração plasmática de colesterol se encontra entre 240 a 280 mg/dl, sendo que, neste grupo, a restrição dietética de colesterol é, provavelmente, mais útil, uma vez que pode provocar a redução das concentrações a níveis próximos à normalidade. Entretanto, se a restrição dietética não produzir uma redução adequada no colesterol, faz-se necessário a administração de fármacos com atividade hipocolesterolêmica associado ao regime de tratamento (MONTGOMERY, 1996).

Os níveis de referência recomendáveis para os indicadores de riscos de aterosclerose ainda são objeto de discussão, uma vez que os mesmos podem sofrer variação em decorrência da população que se queira avaliar. O *Expert Panel National Cholesterol Education Program* (NCEP), o estudo de *Framingham* sobre coronariopatia, bem como, o *National Institute of Health Consensus Conference*, procuraram apontar o papel dos níveis lipêmicos sobre os riscos de incidência de coronariopatia (RAVEL, 1995) cujos valores se encontram nas tabelas 1 e 2.

Para o presente trabalho, foram adotadas as recomendações propostas pelo Sociedade Brasileira de Cardiologia (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2001), cujos valores de referência estão apresentados na tabela 3.

Tabela 1. Níveis de colesterol total e colesterol das LDL associados a riscos de incidência de coronariopatia, de acordo com o NCEP.

Parâmetro	Desejável	Alto risco limítrofe	Risco elevado
Colesterol total (mg/dl)	<200	200-239	≥ 240
Colesterol das LDL (mg/dl)	<130	130-159	≥ 160

Tabela 2. Correlação entre os níveis de colesterol total e colesterol das HDLs associados a riscos de incidência de coronariopatia, de acordo com o estudo de *Framingham*.

Risco relativo	Colesterol das HDLs (mg/dl)		Colesterol total/colesterol das HDLs (mg/dl)	
	homens	mulheres	homens	mulheres
½ do risco médio	60	70	3,4	3,3
risco médio	45	55	5,0	4,4
2 x risco médio	25	35	10	7,0
3 x risco médio	-	-	24	11

Tabela 3. Valores de referência do perfil lipêmico recomendados pela Sociedade Brasileira de Cardiologia.

Parâmetros	Valores *	Categoria
Colesterol total (mg/dl)	≤ 200	Ótimo
	200-239	Limítrofe
	≥ 240	Alto
LDL-colesterol (mg/dl)	< 100	Ótimo
	100-129	Desejável
	130-159	Limítrofe
	160-189	Alto
	≥ 190	Muito alto
HDL-colesterol (mg/dl)	< 40	Baixo
	> 60	Alto
Triglicerídeos (mg/dl)	< 150	Ótimo
	150-200	Limítrofe
	200-499	Alto
	≥ 500	Muito alto
VLDL-colesterol (mg/dl)	< 40	Desejável

* Valores de referência para indivíduos maiores de 20 anos de idade.

1.4 HIPERLIPIDEMIAS E ATEROSCLEROSE

Vários distúrbios genéticos e adquiridos influenciam nas vias endógena e exógena do metabolismo das lipoproteínas, resultando em hiperlipidemia e predispondo ao desenvolvimento de aterosclerose (CHUN, 1999).

A aterosclerose têm ocorrido com mais frequência em indivíduos com certas condições e hábitos de vida, quando comparados com a população em geral. Tais condições foram designadas como fatores de risco e, entre eles, se encontram: sexo,

idade avançada, história familiar de cardiopatia isquêmica, hiperlipidemia, hipertensão, baixo nível de HDL-colesterol e alto nível de LDL-colesterol, *diabetes mellitus*, hiperinsulinemia, obesidade, tabagismo e inatividade física (ALEXANDER, 2001; SYVANNE, 2001; PITTILO, 2000)

Tanto a hipercolesterolemia como a hipertrigliceridemia parecem ser fatores de risco importantes para a aterosclerose. Os aumentos nos níveis de colesterol estão associados, principalmente, a uma elevação nas concentrações das LDLs, enquanto que os aumentos de triglicerídeos estão associados a uma elevação das VLDLs e remanescentes de seu catabolismo, principalmente as IDLs (MEYER, 2000). Tem-se demonstrado que o nível de HDL se encontra inversamente associado ao desenvolvimento de aterosclerose, podendo, portanto, ser considerado como um “fator anti-risco” (REAL, 2001).

A elevação dos níveis de LDL plasmática pode aumentar a velocidade de sua penetração na parede arterial, onde sofrem processo de oxidação por agentes oxidantes, tais como, ânions superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, transformando-se em LDL oxidada (oxi-LDL) (KÁDÁR & GLASZ, 2001). As oxi-LDLs se depositam na camada íntima arterial, sendo capazes de provocar citotoxicidade no endotélio vascular, bem como, inibição da saída de LDL, que se acumulam na parede do vaso. Posteriormente, as oxi-LDLs são consumidas por macrófagos, que se tornam “células em espuma”. Estas células se acumulam na camada íntima, liberando agentes quimiotáticos, capazes de aumentar o recrutamento das LDL plasmáticas, e fatores de crescimento, que levam à migração e proliferação das células musculares lisas, as quais produzem grande quantidade de colágeno, elastina e proteoglicanos. O resultado destes eventos é a formação de uma placa ateromatosa, composta de uma cobertura fibrosa com células musculares lisas, macrófagos, “células em espuma”, linfócitos, colágeno, elastina, proteoglicanos e de um centro necrótico compostos de restos celulares, cristais de colesterol e cálcio (STANLEY & ROBBINS, 1991).

A medida em que as placas aumentam de tamanho, progressivamente invadem a luz da artéria, bem como, a camada média subjacente, tendo como conseqüências o comprometimento do fluxo sanguíneo, o enfraquecimento das artérias e uma variedade de complicações, tais como, calcificação, ulceração, formação de trombos, entre outros distúrbios (KÁDÁR & GLASZ, 2001). A placa aterosclerótica está representada na figura 3.

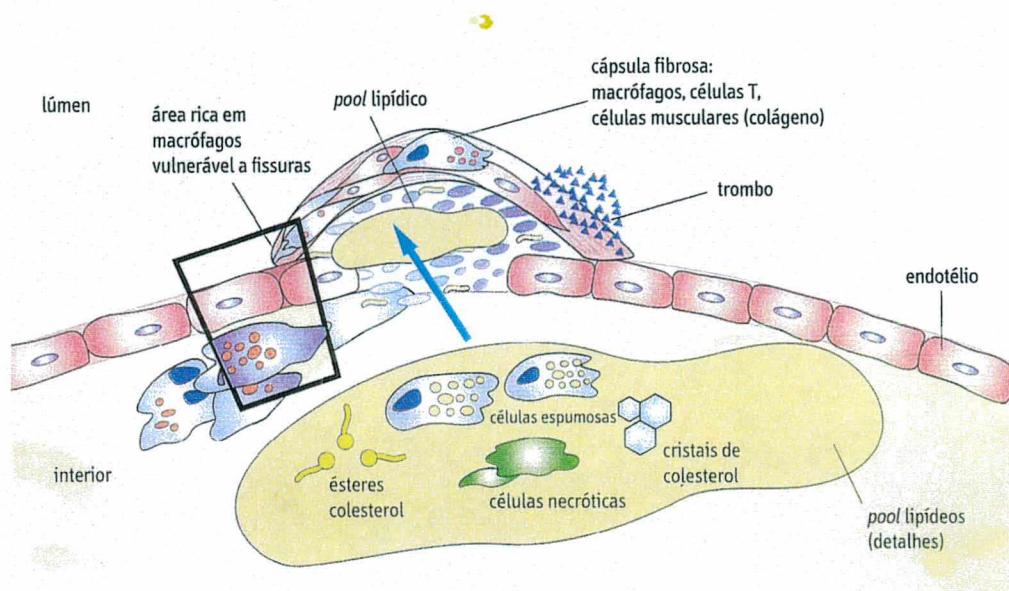


Figura 3. Placa aterosclerótica (BAYNES & DOMINICZAK, 2000)

1.5 OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA HIPERLIPIDEMIAS

Apesar do grande número de pessoas acometidas por doenças cardiovasculares associadas aos elevados níveis plasmáticos de lipídeos, ainda são poucas as opções terapêuticas disponíveis para a prevenção ou tratamento destas enfermidades. Dentre as opções, pode-se destacar: os inibidores competitivos da HMG-CoA redutase, os ácidos fibrícos, as resinas sequestradoras de ácidos biliares e as fibras dietéticas (HOPKINS, 2000; SPIEKER, 2000; ELLEGARD, 2000; BROWN, 1998).

Os inibidores competitivos da HMG-CoA redutase são fármacos obtidos de fungos, sendo que os primeiros a serem estudados foram a lovastatina e a mevastatina. Estes medicamentos bloqueiam a síntese de colesterol no fígado, desencadeando com isso as reações compensadoras que determinam uma redução dos níveis plasmáticos de LDL (GOTTO, 2000; DOWNS, 1998). A lovastatina é capaz de reduzir as concentrações plasmáticas de LDL que variam de 20%, com 10 mg ao dia, até 40%, com 80 mg ao dia; no entanto, pode causar vários efeitos indesejáveis no trato gastrointestinal, cefaléia ou exantema cutâneo (KONG, 1997). Em cerca de 2% dos pacientes, ocorre o aumento dos níveis séricos de transaminases hepáticas e miopia,

podendo também causar um pequeno aumento da atividade da creatina fosfoquinase (DUJOVNE, 1991). Este fármaco é contra indicado para mulheres grávidas ou em idade de procriação que podem engravidar, pois possui efeitos teratogênicos (DUJOVNE, 1991).

Outra classe de fármacos utilizados para o tratamento das hiperlipidemias é a dos ácidos fibrícos, sendo muito eficazes para o tratamento das hipertrigliceridemias, diminuindo consideravelmente os níveis plasmáticos da VLDL, mas, no entanto, não se mostra eficaz na prevenção da aterosclerose (WATTS, 1999). Os ácidos fibrícos, apesar de serem bem tolerados, apresentam efeitos indesejáveis, como distúrbios gastrointestinais (dor abdominal, diarreia e náuseas), visão embaçada, aumento de peso corporal, impotência, leucopenia e anemia (SMELLIE, 1992).

Uma outra opção no combate ao excesso de lipídeos circulantes, são as resinas seqüestradoras de ácido biliares que, por não serem absorvidas no trato gastrointestinal, constituem, talvez, os fármacos que causam menores alterações metabólicas (OOI, 1998). A resina mais comumente usada é a colestiramina, um cloridato de uma resina básica de troca iônica. Além desta, vem sendo utilizado o cloridrato de colestipol, um copolímero da dietilpentamina e da epicloridrina, sendo ambos agentes hidrofílicos, porém insolúveis em água (FURRER, 1994). Estes agentes não são afetados por enzimas digestivas, permanecendo inalterados no trato gastrointestinal e tão pouco são absorvidos (FURRER, 1994).

As resinas seqüestradoras de ácidos biliares agem intensificando a excreção do esteroide neutro e aumentando, de modo indireto, o catabolismo das LDLs, reduzindo, desta forma, as concentrações de colesterol no plasma. Este efeito sobre a LDL está relacionada à dose e, em geral, situa-se na faixa de 20% de redução (EINARSSON, 1991).

Durante as primeiras semanas de tratamento com as resinas seqüestradoras de ácidos biliares, os níveis plasmáticos de triglicérides aumentam em 5 a 20%; no entanto, esta elevação costuma desaparecer gradualmente dentro de 4 semanas e as concentrações de triglicérides retornam a valores de pré-tratamento (OOI, 1998). Em pacientes com concentrações elevadas de VLDL e IDL, este aumento de triglicérides costuma ser maior e as elevações de VLDL e IDL mais prolongada. Por estas razões, as resinas seqüestradoras de ácidos biliares são eficazes somente quando houver excesso

de LDL, não apresentando nenhum efeito previsível sobre os níveis de HDL (BROWN, 1998).

Quando se suspende a terapia com resina, a concentração plasmática de lipídeos aumenta rapidamente e, a seguir, aproxima-se lentamente dos valores de pré-tratamento, no decorrer de um período de 3 a 4 semanas (BROWN, 1998). Portanto, estas resinas não devem ser utilizadas por pessoas com altos níveis plasmáticos de triglicerídeos, pois podem agravar a hipertrigliceridemia. Além de aumentar as concentrações plasmáticas de triglicerídeos, as resinas seqüestradoras de ácidos biliares costumam aumentar, transitoriamente, as atividades da fosfatase alcalina e das transaminases hepáticas (SMELLIE, 1992).

Embora o reconhecido efeito hipocolesterolêmico da colestiramina tenha levado a sua utilização terapêutica no tratamento da aterosclerose e outras doenças vasculares obstrutivas, alguns pesquisadores sugerem que esta resina está associada com o câncer de cólon em ratos e humanos, o que tem limitado o seu uso terapêutico (JENNINGS, 1988). Além disso, não está isenta de outros efeitos indesejáveis, como inchaço abdominal, flatulência, constipação associada a náuseas e vômitos (MALLOY, 1996) .

Outra terapêutica recomendada é a utilização de fibras alimentares, cujo consumo tem se afirmado como base de um estilo de vida saudável, oferecendo, com isso, proteção contra várias enfermidades, como *diabetes mellitus*, doença coronariana, isquemia cardíaca, obesidade e os mais diversos distúrbios do aparelho digestivo (JENKINS, 2000). As fibras constituem parte de todo o alimento vegetal, como cereais, frutas, hortaliças e leguminosas, mas podem também ser encontradas no exoesqueletos de insetos e crustáceos, não sendo digeridas pelo organismo humano (CRAUSTON, 1988).

Alguns tipos de fibras dietéticas tem apresentado atividade hipocolesterolêmica, tanto em experimento com animais de laboratório, quanto em ensaios com humanos (JENKINS, 2000). Estas fibras têm a capacidade de ligar-se aos sais biliares no intestino, diminuindo sua reabsorção, o que resulta em menos colesterol disponível para a síntese de lipoproteínas.

Cada fibra tem diferentes propriedades físico-químicas que determinam a extensão com que a absorção do colesterol é inibida. Apesar de que o processo de absorção do colesterol no trato intestinal seja complexo, a eficiência desta absorção é, principalmente, dependente da solubilidade das micelas e, conseqüentemente, da

quantidade e composição de sais biliares, bem como, ácidos graxos e monoglicerídeos, que são formados durante o processo de digestão pela lipase pancreática (VAHOUNNY, 1983).

1.6 QUITOSANA E ASSOCIAÇÕES COMO ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA HIPERLIPIDEMIAS

1.6.1 Quitosana

A quitosana é um biopolímero composto de unidades de glicosamina e glicosamina N-acetilada (2-acetilamino-2-deoxi-D-glicopiranoose) unidas por ligação glicosídica (1→4), obtida pela desacetilação da quitina, a qual é largamente encontrada como constituinte de exoesqueleto de artrópodes, como caranguejo, camarão, lagosta e insetos, sendo também produzida, extracelularmente, por fungos e algas (MAJETI & KUMAR, 2000; KOIDE, 1998).

A quitosana tem apresentado propriedades hipocolesterolêmicas semelhantes a da colestiramina, produzindo um equilíbrio entre o colesterol proveniente da dieta e o sintetizado no fígado, podendo, desta forma, ser definida química e fisicamente como uma fibra dietética que não é degradada pelas enzimas digestivas humanas (MUZZARELLI, 1997; SUGANO, 1978; KRITCHEVSKY, 1977). A quitosana é um polissacarídeo que possui uma viscosidade semelhante a certas fibras provenientes da dieta, como goma guar e a pectina (VAHOUNNY, 1983; YASUHIKO, 1983); é solúvel em ácidos orgânicos ou minerais diluídos, mas precipita em pH superior a 6,0. Estas características de fibra atribuem à quitosana propriedades hipocolesterolêmicas, além de diminuir os níveis plasmáticos de triglicerídeos e provocar um aumento de HDL-colesterol, levando a uma excreção fecal do esteroide neutro (SUGANO, 1978; IKEDA, 1993).

A quitosana pode funcionar como uma resina de troca iônica fracamente básica, podendo se ligar com ânions hidrofóbicos, tais como os ácidos biliares, em pH baixo similar ao do trato gastrointestinal, formando micelas que não são dissolvidas pelos ácidos gástricos, sendo excretadas nas fezes (RAZDAN, 1996). Este polímero é também capaz de inibir a digestão de lipídeos, onde, na forma dissolvida, liga-se aos mesmos a nível estomacal, assumindo forma de gel a nível intestinal, formando micelas lipídicas

rígidas que não sofrem o ataque de enzimas pancreáticas e intestinais, sendo excretadas nas fezes, conforme mecanismo proposto por KANAUCHI (1995)

Estudos têm demonstrado que a quitosana composta de seis ou mais oligossacarídeos, de grau moderado de glicosamina desacetilada, bem como, de alta viscosidade, tem ação mais efetiva no bloqueio da absorção de colesterol e triglicerídeos a nível gastrointestinal, por aumentar a sua ligação com os mesmos. MUZZARELLI (1997) sugere ser necessário um certo grau de polimerização para provocar a atividade hipocolesterolêmica, onde polímeros hidrolisados acima de 10kDa seriam mais efetivos no aumento da excreção fecal de esterol neutro.

1.6.2 Estudos do efeito hipolipemiante da quitosana em animais

Alguns trabalhos também têm demonstrado um significativo efeito redutor de colesterol (25 a 30%) em ratos submetidos a dieta rica em colesterol e suplementados com quitosana (2-5%), sem afetar a alimentação ou o crescimento dos animais (SUGANO, 1980).

Outro estudo evidenciou a atividade redutora de colesterol em ratos machos submetidos à dieta de 1% de colesterol e 0,2% ácido cólico quando suplementados com quitosana, apresentando uma diminuição de 54% de colesterol plasmático e 64% colesterol hepático (SUGANO, 1988).

Suplemento com quitosana também preveniu o decréscimo de HDL-colesterol no plasma, o aumento no peso de fígado e o decréscimo dos níveis de HMG-CoA redutase induzida pelo colesterol da dieta em ratos. Estes resultados sugerem que a quitosana tem ação de manutenção da homeostase do colesterol (SUGANO, 1988).

Estudos realizados com animais de laboratório demonstraram que dietas contendo uma concentração de 5% de quitosana podem diminuir os níveis sanguíneos de colesterol, aumentar significativamente o nível de HDL-colesterol, podendo ser administrada em uma concentração de até 10% com segurança, pois possui uma baixa toxicidade (LEHOUXI, 1993).

A quitosana, quando administrada a 5% da dieta em camundongos normal e neonatal diabético streptozotocina-induzido, foi capaz de diminuir os níveis de glicose sanguínea, colesterol e triglicerídeos após 4 semanas de tratamento. No entanto, em camundongos KK-AY, do tipo obeso *diabetes mellitus* insulino não dependente

(DMIND) com hiperinsulinemia, estes parâmetros não foram afetados, sugerindo que a quitosana pode ser utilizada para o tratamento de DMIND com quadro de hipoinsulinemia (MIURA, 1995).

Quitosana de diferentes viscosidades, quando administradas em aves, provocou a redução de colesterol plasmático e um acréscimo de HDL-colesterol, resultando em um aumento da razão HDL-colesterol/colesterol total, sendo que, a quitosana de baixa viscosidade provocou a redução nos níveis de triglicerídeos plasmático (RAZDAN, 1996 e 1994).

Também tem sido demonstrado que a suplementação com quitosana em animais de laboratório reduziu em 26% a digestibilidade intestinal de lipídeos, quando comparada com animais controles não suplementados, sendo a influência hipolipidêmica da quitosana atribuída à interrupção da circulação entero-hepática de ácido biliar (RAZDAN, 1997).

Estudos foram realizados para avaliar o efeito da dieta com quitosana sobre colesterol sérico e aterosclerose, utilizando-se camundongos deficientes de apolipoproteína E como modelo de aterosclerose. Os animais foram submetidos, durante 20 semanas, à dieta contendo 5% de quitosana. Os níveis de colesterol sérico apresentaram significativa redução (64%) nos animais suplementados com quitosana, quando comparado ao grupo controle não suplementados. A placa aterosclerótica na aorta e no área do arco aórtico estava significativamente reduzida (42 e 50% respectivamente) no grupo suplementado com quitosana, com redução de aterogênese. Estes resultados demonstraram a existência de uma correlação direta entre a diminuição de colesterol na suplementação com quitosana e a inibição de aterogênese, sugerindo que a quitosana poderia ser utilizada como agente inibidor do desenvolvimento de aterosclerose em indivíduos hipercolesterolêmico (DOUGLAS, 1998)

Estudos do efeito da quitina ou quitosana sobre a atividade da lipase pancreática *in vitro* e no grau armazenamento de lipídeos foram feitos em ratos submetidos a dietas ricas em lipídeos e tratados com os dois polímeros, por nove semanas. Os resultados demonstram que os polímeros previnem o aumento do peso corpóreo, a hiperlipidemia e fígado gorduroso induzido pela dieta rica em lipídeos. Também é sugerido que o sítio de ação da quitina e quitosana na atividade da lipase pancreática não é em nível de enzima, mas de substrato, sendo que o efeito anti-obesidade dos polímeros em ratos

estaria relacionado com a inibição da absorção intestinal de lipídeos da dieta (HAN, 1999)

Em outro estudo foi avaliado o efeito sobre a absorção e excreção de colesterol, lipídeos e ácido biliar em ratos submetidos à dieta contendo colesterol e suplementados com quitosana, quitosana/glucomanose, glucomanose e celulose (controle) durante 18 dias. Os resultados obtidos demonstraram que colesterol hepático reduziu, significativamente, nos grupos suplementados com quitosana e quitosana/glicomanose, quando comparado ao grupo controle. A viscosidade do conteúdo do sobrenadante intestinal se mostrou aumentada no grupo com glicomanose e quitosana/glicomanose. A absorção do colesterol, apresentou redução significativa de 37,5% no grupo controle, de 20,2% no grupo com glicomanose, de 18,2% no grupo com quitosana/glicomanose e de 9,4% no grupo com quitosana. A excreção fecal de lipídeos e de ácidos biliares aumentou, significativamente, no grupo suplementado com quitosana/glicomanose e com quitosana, quando comparados com o controle e glucomanose. Os resultados sugerem que a diminuição de colesterol hepático no tratamento com glicomanose estaria associada à alteração na absorção do colesterol influenciada pela viscosidade intestinal e, no caso da quitosana, seria por diferente mecanismo (GALLAHER, 2000).

Ratos machos Sprague-Dawley foram submetidos, durante 4 semanas, à dieta rica em colesterol e suplementada com 5% de quitosana de diferentes viscosidade e massa molar, sendo o grupo controle suplementado com 5% de celulose. Os resultados demonstraram uma significativa redução de colesterol, LDL-colesterol e VLDL-colesterol nos ratos suplementados com quitosana, bem como significativo aumento de colesterol e triglicérides no conteúdo fecal. Não houve diferenças de peso dos animais, sendo que os ratos com dieta suplementada com quitosana apresentaram significativa diminuição do peso do fígado, quando comparado ao controle. O suplemento com quitosana diminuiu os níveis de lipídeos e colesterol total do fígado, quando comparado ao controle, sendo a diminuição mais efetiva no suplemento com quitosana de baixa viscosidade. Quanto à avaliação da lipoperoxidação, os níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) apresentaram-se aumentados, a nível hepático, nos grupos suplementados com quitosana de alta viscosidade. Foi observado um aumento da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase no grupo suplementado com quitosana de baixa viscosidade. Os resultados sugerem que o efeito da quitosana de diferentes viscosidades nos níveis de lipídeos plasmáticos e hepáticos, bem como na

lipoperoxidação, depende de sua massa molar, embora a ação hipocolesterolêmica da quitosana com diferentes viscosidades tenha sido semelhante (CHIANG, 2000).

1.6.3 Estudos clínicos com a quitosana

Estudos clínicos têm demonstrado que a ingestão de quitosana em dose de 3-6g/dia por duas semanas em 8 indivíduos adultos saudáveis do sexo masculino produziu um decréscimo significativo de colesterol total sérico (188mg/dl para 177mg/dl) e um aumento nos níveis de HDL-colesterol sérico (51 mg/dl para 56 mg/dl). Também houve um aumento da excreção de ácido biliar primário, ácido cólico e quenodeoxicólico nas fezes, levando ao decréscimo da reabsorção do ácido biliar e conseqüente decréscimo do colesterol sérico (MAEZAKI, 1993)

A quitosana administrada em pacientes saudáveis voluntários produziu um significativo decréscimo de fenol fecal, p-cresol e indol (MUZZARELLI, 1997)

Pacientes com deficiência renal crônica submetido à hemodiálise foram tratados com tabletes de 45mg de quitosana, três vezes ao dia, durante 1 semana. Houve efetiva redução de colesterol sérico, de $10,14 \pm 4,40$ mM para $5,82 \pm 2,19$ mM, e aumento de hemoglobina sérica de $58,2 \pm 12,1$ para $68,0 \pm 9,0$ g/l⁻¹. Uma significativa redução de uréia e creatinina sérica foi observada após 4 semanas de ingestão de quitosana, estando o vigor físico, o sono e o apetite dos pacientes, significativamente aumentados, quando comparados com o grupo controle. Os dados demonstraram que ao tratamento com quitosana foi efetivo em pacientes com deficiência renal (JING, 1997).

O efeito anti-obesidade da quitosana foi avaliado em 34 pacientes voluntários obesos, em um ensaio randomizado duplo cego, que receberam 4 cápsulas diárias durante 28 dias, sendo avaliado o peso no início, em 14 e 28 dias do tratamento. Foi mantida dieta normal e observado o tipo e quantidade de alimento consumido, bem como efeitos indesejáveis. Após 4 semanas de tratamento, o peso corpóreo e os níveis de colesterol sérico, triglicerídeos, vitamina A, D, E e β -caroteno não apresentavam diferença significativa em relação ao controle placebo, estando, porém, a vitamina K, significativamente aumentada nos tratados com quitosana. Os resultados demonstraram que a administração de quitosana, sem alteração da dieta, não provocou a redução de peso em pacientes obesos e não apresentou efeitos indesejáveis (PITTLER, 1999).

Em outro estudo duplo-cego, 51 pacientes obesos do sexo masculino foram tratados com 3 cápsulas diárias de 400 mg de quitosana ou placebo, durante 8 semanas. O peso e os níveis séricos de colesterol, LDL-colesterol e triglicerídeos foram monitorados em 4, 6 e 8 semanas. A redução de LDL-colesterol, após 4 semanas, foi de $0,48 \pm 0,72$ mmol/l ($n = 24$) nos tratados com quitosana e $0,18 \pm 0,58$ mmol/l ($n = 27$; $p = 0,057$) no grupo placebo, sendo que, em 8 semanas, a redução foi de $0,52 \pm 0,69$ mmol/l e $0,31 \pm 0,63$ mmol/l ($p > 0,1$), respectivamente. Não houve alteração significativa de colesterol total e HDL-colesterol séricos no tratamento com quitosana, porém, houve acréscimo moderado de triglicerídeos, quando comparado com o grupo placebo. A quitosana mostrou-se bem tolerada, não apresentando sérios efeitos indesejáveis, nem alterações de parâmetros como vitamina A e E, ferro ou transferrina (WUOLIJOKI, 1999).

Ensaio *in vitro* demonstraram que esfera de quitosana/O-carboximetil foi capaz de adsorver LDL-colesterol, sem afetar significativamente os níveis de HDL e proteína total em plasma (YIHUA & BINGLIN, 1997)

Além da utilização da quitosana para a redução de lipídeos plasmático, controle de obesidade, prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, tem-se avaliado sua utilização na prevenção ou tratamento de várias outras doenças, tais como, asma, dermatites atópica, hipertensão, degeneração macular, artrites, câncer, diabetes, osteoporose. Além disso, outras propriedades têm sido atribuídas ao polímero, como redução da absorção de minerais e de vitaminas lipossolúveis, excreção fecal de ácido biliar, cicatrização de ferimento, atividade citotóxica, atividade quimiotática celular, atividade antimicrobiana, ação sobre o sistema imune (produção de imunoglobulinas, atividade adjuvante, produção de citocinas, fixação alveolar de macrófago), atividade antitumoral, atividade antigenotóxica, osteogênese, adesão pós-cirúrgica, entre outras (KOIDE, 1998).

Entretanto, pesquisas têm demonstrado alguns efeitos indesejáveis da quitosana, podendo-se citar o impedimento da absorção de minerais e redução do conteúdo mineral ósseo após 2 semanas de administração do polímero, sendo que tais eventos aumentam os riscos de desenvolvimento de osteoporose ou agrava seu quadro clínico (DEUCHI, 1995). Outro efeito indesejável atribuído à quitosana é a redução da absorção de vitaminas lipossolúveis tais como vitamina E e vitamina D, acarretando em deficiência de cálcio. Além disso, tem-se demonstrado a redução da absorção de selênio

e magnésio (elementos essenciais ao metabolismo celular) após ingestão prolongada de quitosana como suplemento alimentar, bem como da absorção de zinco e modificação do conteúdo ósseo (KONDO & OSADA, 1996). Também tem-se observado o retardo no crescimento em animais tratados com quitosana em doses elevadas, sendo tal efeito também monitorado em crianças a adultos (KOIDE, 1998). A quitina/quitosana tem provocado má digestão, bem como diarreia e constipação em humanos (KOIDE, 1998).

1.6.4 Associação quitosana/*Brassica olearaceae*

Alguns pesquisadores têm sugerido que o ácido ascórbico é capaz de diminuir a viscosidade estomacal, facilitando a dissolução da quitosana e aumentando a ligação desta com os lipídeos (DEUCHI, 1995). Então, pode-se dizer que o ácido ascórbico possui um efeito sinérgico, pois aumenta a ligação da quitosana com as gorduras, impedindo, com maior eficiência, a absorção dos lipídeos (DEUCHI, 1995). O ácido ascórbico possui ação hipocolesterolêmica e, desta forma, além de auxiliar no *status* antioxidante do organismo, poderia intensificar a ação da quitosana como agente hipocolesterolêmico (VILSON, 1998; EVANS, 1999).

Tem-se demonstrado que o ácido ascórbico é capaz de inibir o processo de oxidação das LDLs e de adesão dos leucócitos ao endotélio vascular, o que contribui para a o impedimento de aterogênese e consequente disfunção vascular (CARR, 2000).

O efeito do ácido ascórbico sobre os níveis de lipídeos séricos, peroxidação lipídica e *status* antioxidante enzimático e não enzimático, foi avaliado em voluntários idosos saudáveis de ambos os sexos, após 30, 60 e 90 dias de suplemento vitamínico. Os resultados demonstraram que a suplementação com ácido ascórbico foi capaz de provocar a diminuição dos níveis séricos de colesterol, triacilgliceróis, fosfolipídeos e lipoperóxidos. Foi também observado o aumento do potencial de ação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, tais como, a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e glutathione-S-transferase (JAYACHANDRAN, 2000).

Também tem sido demonstrado que a suplementação com ácido ascórbico foi capaz de provocar a redução nos níveis séricos de VLDL, LDL, triglicérides e aumentar os níveis de HDL em pacientes com câncer de mama submetidos à terapia hormonal, a qual tem provocado a elevação dos níveis de lipídeos séricos, como um dos efeitos indesejáveis (BABU, 2000).

Estudos epidemiológicos, triagens clínicas e ensaios com animais de laboratório, têm demonstrado que dietas contendo flavanóides, isoflavanóides, isoflavonas e polifenóis têm contribuído para a prevenção de doenças coronarianas, em especial, a aterosclerose (FRANCESCO, 2000). O mecanismo de ação destes compostos estaria associado a propriedade antioxidante, sendo capazes de provocar a inibição da lipoperoxidação das LDLs (DAVID, 2001).

Carotenóides, tais como, alfa-caroteno, beta-caroteno e licopeno, também têm apresentado atividade antioxidante e antiaterogênica em animais de laboratório e em ensaios clínicos, sendo que o mecanismo de ação proposto estaria relacionado à capacidade destes compostos em atuarem como neutralizadores de radicais livres envolvidos na lipoperoxidação das LDLs em processo de aterogênese (ROOB, 2001; AVIRAM, 2000).

O efeito hipocolesterolêmico do beta-caroteno e licopeno também foi observado, onde o suplemento com 60mg/dia de licopeno durante 3 meses foi capaz de provocar a redução de 14% da concentração plasmática de LDL-colesterol em humanos (FUHRMAN, 1997). Em ensaio *in vitro*, tanto o beta-caroteno, como o licopeno foram capazes de reduzir a síntese de colesterol em 63% e 73 %, respectivamente, via inibição da HMG-CoA redutase em macrófagos (FUHRMAN, 1977).

Neste sentido, poderia-se melhorar o efeito hipocolesterolêmico da quitosana, associando esta a uma planta que possua uma quantidade importante de ácido ascórbico e, ao mesmo tempo, antioxidantes como flavonóides, carotenóides, polifenóis e glicosinolatos, os quais possuem efeitos benéficos sobre o colesterol e paredes vasculares (SIMÕES, 2000; SCHONHOF & KRUMBEIN, 1996; LEJA, 2001; HOLLMAN & ARTS, 2000; ROSA & RODRIGUES, 2001).

Trabalhos na literatura têm demonstrado que na *Brassica olearaceae* L. (brócolis) estão presentes ácido ascórbico, flavonóides (ex: flavonóis, flavonas e flavanóis), carotenóides (ex: alfa-caroteno, beta-caroteno, trans-beta caroteno, licopeno, beta-criptoxantina, luteína, zeaxantina e neoxantina), glicosinolatos (ex: glicorafanina, gliconapina, glicobrassicina e sinigrina) e derivados (ex: isocianatos e indóis), bem como, compostos fenólicos, justificando a escolha desta planta como modelo a ser associado à quitosana. (SLATTERY, 2000; HOLLMAN & ARTS, 2000; ROSA & RODRIGUES, 2001).

Estudos têm demonstrado que esta crucifera tem um importante efeito antioxidante e hipocolesterolêmico, bem como, estaria associada a diminuição do risco de doenças coronarianas (VANG, 1995; KLEIN & KURILICH, 2000; PLUMB, 1997; YOCHUM, 1999).

Além disso, em trabalho realizado junto aos laboratórios Grupo de Pesquisa em Quitina e Aplicações Tecnológicas (QUITECH) e de bioquímica da UFSC, observou-se uma potenciação do efeito hipocolesterolêmico de um derivado de quitosana (quitosana hidrossolúvel) quando este foi associado ao extrato da *Brassica oleraceae* (dados ainda não publicados).

Também tem-se mostrado que a *Brassica oleraceae* é capaz de reduzir a incidência, multiplicidade e índice de desenvolvimento de processos carcinogênicos (ex: câncer de reto, cólon e de mamas) em animais de laboratório e em humanos (VAN POPPEL, 1999; FAHEY & STEPHENSON, 1999).

1.6.5 Associação quitosana/*Aloe vera*

Trabalhos na literatura têm demonstrado que a *Aloe vera* L. (*babosa*) apresenta propriedades laxativa e hipolipemiante (BRUNETON, 1991; REYNOLDS, 1999). A atividade laxante tem sido atribuída à presença de antraquinonas, também denominadas de antranóides, derivados antracênicos ou derivados hidroxiantracênicos, os quais estão presentes na *Aloe vera*, podendo-se citar o aloesin, neoaloesin A, isoaloesin D, aloin A e B, aloe-emodim, entre outros (ADRIANE, 2000; PARK, 1998).

A propriedade laxativa da *Aloe vera* associada a *celandin* e *psyllium* foi avaliada em um tratamento duplo-cego em 35 pacientes adultos de ambos os sexos, com constipação crônica, que receberam durante 28 dias cápsulas contendo a associação ou placebo. Os resultados demonstraram que a associação foi efetiva no tratamento da constipação, quando comparada ao placebo (ODES, 1991).

O efeito hipolipemiante da *Aloe vera* também tem sido observado, quando administrada oralmente em pacientes com diabetes, durante 2 semanas, onde foi capaz de reduzir os níveis séricos de açúcar e de triglicerídeos (YONGCHAIYUDHA, 1996). Outro trabalho tem demonstrado que preparações utilizadas na medicina tradicional contendo diversas ervas, entre as quais, *Aloe vera*, foi capaz de provocar a redução dos

níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos machos diabéticos tratados durante 8 semanas (NADA, 1997).

Também tem sido demonstrado na *Aloe vera* a presença de compostos fenólicos com potencial antioxidante, como o 8-C-beta-D-[2-O-(E)-coumaroyl]glucopyranosyl-2-[2-hydroxy]-propyl-metoxo-5-methylchromone, cuja atividade foi avaliada através de ensaios *in vitro*, em termos de lipoperoxidação, utilizando-se homogenatos de cérebros de ratos (LEE, 2000).

O efeito do extrato de *Aloe vera* sobre enzimas da fase I e fase II da biotransformação, bem como, sobre enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica, foi avaliado em camundongos tratados durante 14 dias. Os resultados demonstraram que a *Aloe vera* foi capaz de provocar o aumento nos níveis de citocromo P450 redutase, NADPH-citocromo b5 redutase, glutathione-S-transferase, DT-diaforase, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione redutase em tecidos hepáticos e extra-hepáticos, bem como, de diminuir os processos de lipoperoxidação. Estes resultados sugerem que a *Aloe vera*, além de apresentar um potencial antioxidante, também tem ação favorável sobre o processo de detoxificação de metabólitos reativos provenientes do mecanismo de biotransformação (SINGH, 2000)

A *Aloe vera* também tem sido utilizada no tratamento de doenças de pele, tais como, vitiligo, psoríase, acne, micoses, em queimaduras e ferimentos, bem como no tratamento de úlcera gástrica e como antitumoral, antiinflamatório, antidiabetes (LEE, 2000; OUMEISH, 1999)

A utilização da quitosana como alternativa terapêutica para a hiperlipidemias, entre outros efeitos indesejáveis, tem provocado, principalmente, problemas gastrointestinais comuns às resinas, tais como, náuseas, flatulência e constipação, motivos pelos quais estariam envolvidos na não adesão ou na interrupção da terapia (KOIDE, 1998).

Neste sentido, pensou-se em associar *Aloe vera* à quitosana, uma vez que esta planta tem apresentado propriedades laxativas pelo aumento do trânsito intestinal, o que poderia contribuir para a diminuição dos problemas gastrointestinais, podendo, desta forma, aumentar a adesão à terapia (ODES HS and MADAR Z, 1991; BRUNETON J., 1995).

A partir das propriedades hipolipemiantes observadas em ratos submetidos ao tratamento com o derivado hidrossolúvel de quitosana produzido junto aos laboratórios

do grupo QUITTECH, bem como, do efeito antioxidante conferido à *Brassica olearaceae* e da propriedade laxativa apresentada pela *Aloe vera* é que se propôs avaliar o potencial hipolipemiante da quitosana hidrossolúvel e associações, com vistas se obter alternativas terapêuticas para hiperlipidemias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho se propôs a avaliar possíveis modificações no perfil lipêmico de ratos tratados, a longo prazo, com quitosana, quitosana associada à *Brassica olearaceae* e quitosana associada à *Aloe vera*, bem como realizar ensaios clínicos Fase II em humanos, para se avaliar do real potencial hipolipemiante das diferentes formulações de quitosana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos propostos pelo presente trabalho seriam:

- . Sintetizar e caracterizar a quitosana hidrossolúvel e associações para ser utilizadas nos ensaios pré-clínicos em ratos e clínicos fase II em humanos;
- . Avaliar o efeito hipolipemiante da quitosana hidrossolúvel, através de ensaios pré-clínicos em ratos submetidos a 95 dias de tratamento e de ensaios clínicos fase II em pacientes submetidos a 60 dias de tratamento.
- . Avaliar o efeito hipolipemiante da quitosana hidrossolúvel associada à *Brassica olearaceae*, através de ensaios pré-clínicos em ratos submetidos a 95 dias de tratamento e de ensaios clínicos fase II em pacientes submetidos a 60 dias de tratamento.
- . Avaliar o efeito hipolipemiante da quitosana hidrossolúvel associada à *Aloe vera*, através de ensaios pré-clínicos em ratos submetidos a 95 dias de tratamento e de ensaios clínicos fase II em pacientes submetidos a 60 dias de tratamento.
- . Correlacionar os resultados obtidos nos ensaios pré-clínicos em ratos e clínicos fase II em humanos, com vistas a identificar as formulações mais efetivas em termos de efeito hipolipemiante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DA QUITOSANA HIDROSSOLÚVEL, LACTOSE, *Aloe vera* E *Brassica olearacea*

Os extratos de *Aloe vera* e de *Brassica olearacea*, bem como, a lactose foram adquiridos junto à empresa Jung Indústria e Comércio de Produtos Estéticos, situado no município de Alfredo Wagner/SC.

A síntese da quitosana hidrossolúvel, em escala laboratorial, foi realizada junto aos laboratórios do grupo QUTECH e, em escala semi-industrial, junto à empresa KITO Indústria e Comércio de Produtos Químicos LTDA, sendo todo o processo coordenado pelo Prof. Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira.

A quitina utilizada para a preparação da quitosana foi extraída pelo método de Hackman (HACKMAN, 1953), a partir de amostras de cascas de camarão submetidas ao tratamento com HCl diluído à temperatura ambiente durante 24 horas para desmineralização. O material obtido foi tratado a 60°C com de NaOH diluído durante 12 horas para desproteíntização, sendo a operação repetida por mais duas vezes. A quitina extraída foi lavada com água destilada até pH próximo à neutralidade e seca em estufa a 40 °C, sendo, posteriormente, utilizada para a preparação da quitosana.

A quitosana foi preparada pelo método de Broussignac (BROUSSIGNAC, 1970), a partir da desacetilação da quitina. Para tanto, a quitina extraída foi refluxada com uma mistura de etilenoglicol/etanol contendo KOH 50% m/m a 120 °C durante 2 horas. A quitosana obtida foi lavada com água destilada até pH próximo à neutralidade, filtrada e seca em estufa 40°C, sendo, posteriormente, utilizada para a preparação de seu derivado hidrossolúvel.

A preparação da quitosana hidrossolúvel foi realizada a partir uma solução de quitosana em ácido acético diluído, a qual foi submetida a uma reação de precipitação com HCl concentrado. O processo de preparação da quitosana hidrossolúvel encontra-se resumido na figura 4.

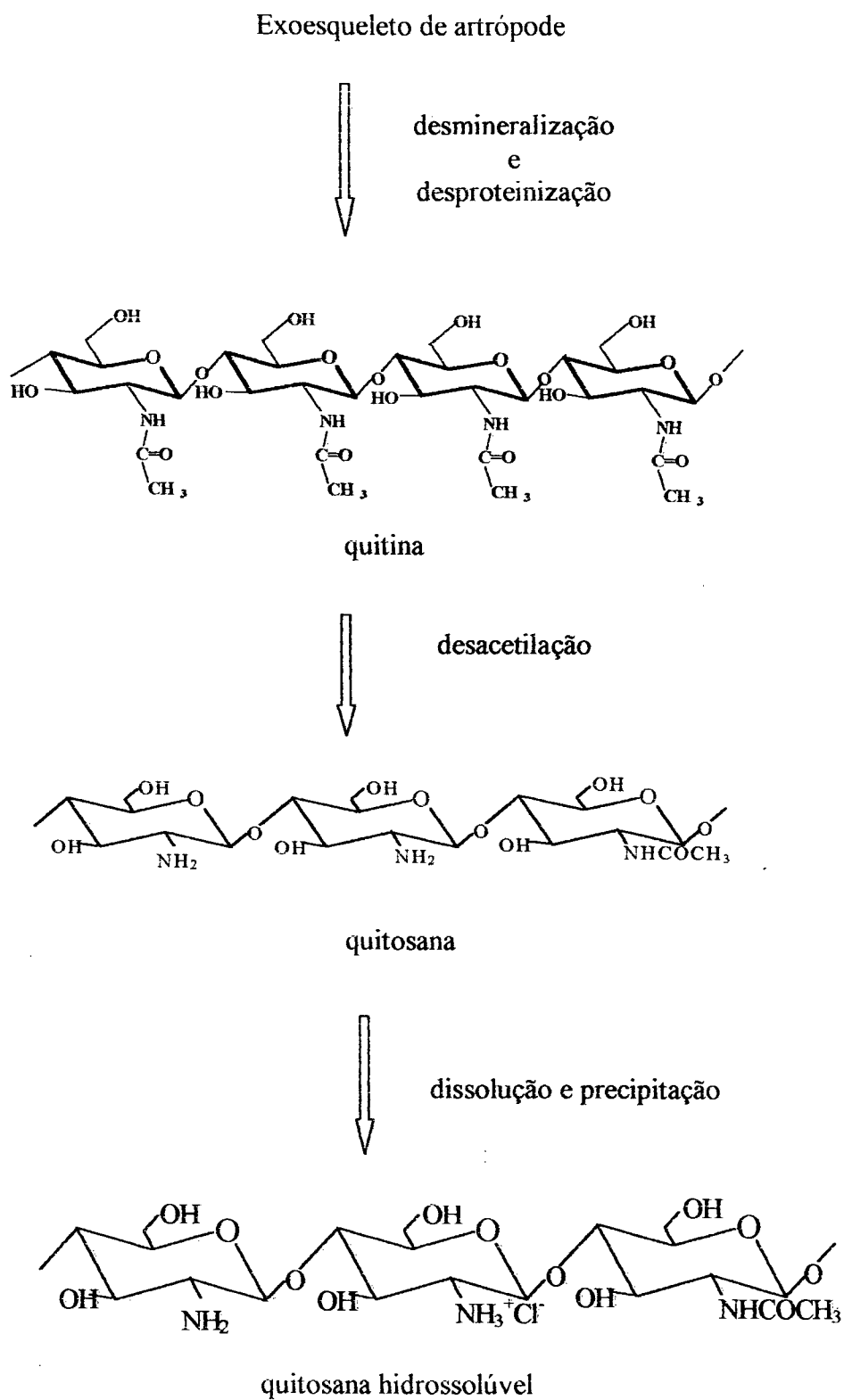


Figura 4. Obtenção da quitosana hidrossolúvel

3.2 PREPARAÇÃO DAS ASSOCIAÇÕES

As associações utilizadas nos ensaios pré-clínicos em ratos foram preparadas junto aos laboratórios do Grupo QUITECH, atendendo as seguintes composições:

- a) lactose
- b) associação quitosana hidrossolúvel/lactose (4:1)
- c) associação quitosana hidrossolúvel/*Brassica olearaceae* (4:1)
- d) associação quitosana hidrossolúvel/*Aloe vera* (4:1)

O processo de produção das cápsulas contendo as associações utilizadas nos ensaios clínicos fase II foi efetuado junto à Indústria Farmacêutica Santa Terezinha situada no Município de Tubarão/SC. As formulações atenderam às seguintes composições:

- a) Cápsulas com 320mg de lactose.
- b) Cápsulas com 256mg de quitosana hidrossolúvel/64mg de lactose (4:1) com total de 320mg.
- c) Cápsulas com 256mg de quitosana hidrossolúvel/64mg extrato de *Brassica olearaceae* (4:1) com total de 320mg.
- d) Cápsulas com 256mg de quitosana hidrossolúvel/64mg extrato de *Aloe vera* (4:1) com total de 320mg.

3.3 CONTROLE DE QUALIDADE DA QUITOSANA HIDROSSOLÚVEL E ASSOCIAÇÕES

O controle de qualidade da quitosana hidrossolúvel e associações foi efetuado através de análises químicas (pH, grau de desacetilação, teor de cinzas, teor de umidade e massa molar), do peso das cápsulas, bem como, da análise microbiológica das diferentes associações.

3.4 ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS EM RATOS

3.4.1 Animais

Ratos Wistar machos com 60 dias de idade e 229 ± 15 g de peso, adquiridos junto ao Biotério Central da UFSC, permaneceram em gaiolas apropriadas à temperatura de 25°C em ciclo 12 horas claro/escuro no decorrer dos diferentes tratamentos. Para as determinações dos parâmetros bioquímicos, os animais foram anestesiados com éter etílico e amostras de sangue foram coletadas por punção no globo ocular e centrifugadas a 3000 rpm. O soro foi retirado e estocado em tempo apropriado em -2 a 4 °C até a realização dos ensaios bioquímicos. Ao final do tratamento, os ratos foram sacrificados, a cavidade abdominal aberta e os órgãos como fígado, rins, baço, pulmão e coração foram pesados e observados, macroscopicamente, quanto ao aspecto anatômico e patológico.

3.4.2 Tratamento dos animais

Os animais foram divididos em 4 grupos (n=5), cada qual submetidos a um tratamento específico por um período de 95 dias, a saber:

Grupo 1- (controle) - ração e água.

Grupo 2 - ração + associação quitosana hidrossolúvel/lactose (4:1) a 4% da ração.

Grupo 3 - ração + associação quitosana hidrossolúvel/ *Brassica olearaceae* (4:1) a 4 % da ração.

Grupo 4- ração + associação quitosana hidrossolúvel/*Aloe vera* (4:1) a 4% da ração.

3.4.3 Determinação dos parâmetros bioquímicos, parâmetros nutricionais e ponderais

Os níveis séricos de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, triglicerídeos, glicose e fosfatase alcalina foram determinados no início e após 35, 65 e 95 dias dos diferentes tratamentos. O consumo de ração e de água, bem como, o peso corpóreo, foram avaliados a cada 5 dias de tratamento.

3.5 ENSAIOS CLÍNICOS FASE II

3.5.1 Tipo de estudo

O protocolo tratou-se de um estudo clínico terapêutico piloto-fase II, visando demonstrar a atividade e estabelecer a segurança, a curto prazo, da quitosana em pacientes dislipidêmicos. Nele, se tentou estabelecer as relações dose-resposta com objetivo de obter sólidos antecedentes para a descrição de estudos terapêuticos ampliados (fase III), bem como, de implementar a pesquisa e o desenvolvimento de biopolímeros para a produção de redutores de colesterol e triglicerídeos.

3.5.2 Considerações éticas

Para a realização dos ensaios clínicos fase II, o presente protocolo foi previamente encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro em 23 de Setembro de 1999/Protocolo N° 77/99-CEP e, posteriormente, submetido à aprovação pelos órgãos governamentais competentes. Estes ensaios constituíram-se de um protocolo mínimo aceito pela Secretaria de Vigilância Sanitária para fins de obtenção de primeiro registro de produtos farmacêuticos no Ministério da Saúde. O protocolo experimental atendeu ao que determina a Resolução 01/88 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisas clínicas, bem como princípios éticos, científicos e técnicos consoante com os padrões de aceitação internacional para ensaios de farmacologia clínica (normas de “Good Clinical Practice”). Cumpre ressaltar que este estudo foi precedido por experimentos em animais realizados pelo grupo QUITTECH, obtendo-se resultados que permitiram uma ampliação dos mesmo para ensaios em humanos, além de já existirem, na literatura, alguns ensaios com humanos (LEHOUXI, 1993; SUGANO, 1988; RAZDAN, 1996 e 1994; DOUGLAS, 1998; MAEZAKI, 1993; JING, 1997).

3.5.3 Pacientes

O protocolo clínico foi desenvolvido através de ensaio randomizado duplo-cego, realizado junto a pacientes pertencentes ao ambulatório de Cardiopatia do Serviço de

Cardiologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF-UFRJ), sob a supervisão do Prof. Dr. Roberto Coury Pedrosa.

Para tanto, foram selecionados pacientes hipercolesterolêmicos e/ou hipercolesterolêmicos/hipertrigliceridêmicos, de ambos os sexos, cooperativos, de idade entre 18 e 60 anos, respeitando-se os critérios de inclusão/exclusão e o consentimento livre e esclarecido. Os critérios de inclusão/exclusão, o formulário de identificação dos pacientes e o formulário do consentimento livre e esclarecido se encontram nos anexos 1, 2 e 3, respectivamente.

3.5.4 Tratamento

Os pacientes foram divididos em 4 grupos, cada qual submetido a um tratamento específico, a saber:

Grupo 1- Tratamento com lactose (placebo) em pacientes hipercolesterolêmicos e/ou hipercolesterolêmicos/ hipertrigliceridêmicos.

Grupo 2- Tratamento com quitosana hidrossolúvel/lactose em pacientes hipercolesterolêmicos e/ou hipercolesterolêmicos/ hipertrigliceridêmicos.

Grupo 3- Tratamento com quitosana hidrossolúvel/*Aloe vera* em pacientes hipercolesterolêmicos e/ou hipercolesterolêmicos/ hipertrigliceridêmicos.

Grupo 4- Tratamento com quitosana hidrossolúvel/*Brassica olearaceae* em pacientes hipercolesterolêmicos e/ou hipercolesterolêmicos/ hipertrigliceridêmicos.

Os pacientes dos respectivos grupos foram tratados diariamente com 8 cápsulas, por um período de 60 dias, perfazendo um total de 2048 mg/dia de quitosana hidrossolúvel, 0,512 mg/dia de extrato de *Brassica olearaceae* e 0,512 mg/dia de extrato de *Aloe vera*. Um inquérito alimentar e acompanhamento clínico foram realizados no início e a cada 15 dias dos diferentes tratamentos.

3.5.5 Determinação dos parâmetros bioquímicos

Os níveis séricos de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, triglicerídeos, glicose e fosfatase alcalina foram determinados no início e após 30 e 60 dias dos diferentes tratamentos.

3.6 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Todos os parâmetros bioquímicos foram determinados utilizando-se sistemas para diagnóstico (kits) adquiridos junto a empresa LABTEST[®].

3.6.1 Colesterol total

O colesterol total sérico foi determinado utilizando-se o método COD-ANA. O método fundamenta-se na reação dos ésteres de colesterol que, em presença de colesterol esterase, forma colesterol e ácidos graxos. O colesterol em presença de oxigênio e colesterol oxidase forma colesteno e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio na presença de 4-aminoantipirina, fenol e peroxidase forma antipirilquinonimina, a qual é medida espectrofotometricamente em 500 nm.

3.6.2 HDL-colesterol

O método fundamenta-se na adição de ácido fosfotúngstico e íons magnésio ao soro, que promovem a precipitação seletiva e quantitativa da VLDL e LDL e, após centrifugação, o colesterol ligado à HDL é determinado no sobrenadante, utilizando-se o sistema enzimático Colesterol COD-ANA, descrito anteriormente.

3.6.3 LDL-colesterol e VLDL-colesterol

As concentrações destas frações foram calculadas, utilizando-se a equação de Friedewald⁴⁴, onde:

$$\text{VLDL-Colesterol} = \text{Triglicerídeos} / 5$$

$$\text{LDL-Colesterol} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL-colesterol} + \text{VLDL-colesterol})$$

3.6.4 Triglicerídeos

Para sua determinação, utilizou-se o método GPO-ANA, onde os triglicerídeos, por ação das lipases lipoproteicas, hidroliza-se, liberando glicerol e ácidos graxos. O glicerol livre, numa sequência de reações enzimáticas catalisadas pela gliceroquinase, glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase, forma um composto corado (antipirilquinonimina), o qual é medido espectrofotometricamente em 510 nm.

3.6.5 Glicose

A glicose foi determinada pelo método GOD-ANA. A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose, em presença de oxigênio e água, formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob a ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento, formando um composto corado (antipirilquinonimina), o qual é medido espectrofotometricamente em 505 nm.

3.6.6 Fosfatase alcalina

O método se baseia na hidrólise da timolftaleína monofosfato pela fosfatase alcalina do soro, liberando composto corado (timolftaleína), o qual é medido espectrofotometricamente em 590 nm.

3.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICOS DOS DADOS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se Análise de Variância (ANOVA), complementada pelos testes Student-Newman-Keulse e Dunnett, quando se fez necessário, admitindo-se um nível de significância de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CONTROLE DE QUALIDADE DA QUITOSANA HIDROSSOLÚVEL E ASSOCIAÇÕES

4.1.1 Análise química da quitosana hidrossolúvel e peso das cápsulas

Os resultados obtidos no controle de qualidade efetuado através da análise química (pH, grau de desacetilação, teor de cinzas, teor de umidade e peso molecular) da quitosana hidrossolúvel, bem como, do peso das cápsulas das diferentes associações, se encontram nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Análise química da quitosana hidrossolúvel

Parâmetro	Método	Resultado
pH (sol. 1% m/v)	Potenciometria	3,00
Grau de desacetilação (%)	Condutimetria	66,73
Teor de cinzas (%)	Gravimetria	0,24
Teor de umidade (%)	Gravimetria	4,57
Massa molar média (KDa)	HPLC	45

Tabela 5. Peso das cápsulas (mg) de quitosana hidrossolúvel e associações

Associação	Peso
lactose	328,7 ± 12,5
quitosana /lactose	296,6 ± 10,0
quitosana / <i>Brassica olearaceae</i>	268,8 ± 5,9
quitosana / <i>Aloe vera</i>	260,0 ± 9,2

Resultados expresso em Média ± Desvio Padrão, n=20.

Os resultados da análise química obtidos no controle de qualidade da quitosana hidrossolúvel e associações estavam em conformidade com os resultados apresentados.

em produtos comerciais similares, sendo que o peso médio das cápsulas apresentaram pequena variação, não comprometendo a dose diária das diferentes associações sugerida nos ensaios clínicos. O grau de desacetilação, bem como, a massa molecular média apresentados pela quitosana hidrossolúvel estavam em conformidade com o sugerido pela literatura.

4.1.2 Análise microbiológica da quitosana hidrossolúvel e associações

Os resultados da análise microbiológica das diferentes associações demonstraram não haver alguma contaminação significativa, garantindo uma maior segurança e efetividade aos diferentes tratamentos. Os resultados da análise microbiológica se encontram no anexo 4.

4.2 ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS COM RATOS

4.2.1 Consumo de água e ração

Os resultados obtidos demonstram que não houve diferença significativa no consumo de água e ração nos ratos submetidos aos diferentes tratamentos durante 95 dias (tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Consumo de água (ml) em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias .

Dias	Tratamentos			
	controle	quitosana /lactose	quitosana/ <i>Brassica olearaceae</i>	quitosana / <i>Aloe vera</i>
5	195,1 ± 3,9	184,4 ± 19,0	197,0 ± 4,8	196,0 ± 5,0
35	240,9 ± 10,3	245,6 ± 13,7	267,8 ± 27,7	228,8 ± 12,4
65	192,6 ± 10,5	219,4 ± 14,5	198,8 ± 9,0	180,0 ± 12,1
95	232,8 ± 13,3	272,5 ± 29,8	222,5 ± 21,0	215,2 ± 27,5

Resultados expressos em Média ± Erro Padrão da Média, n=5.

Tabela 7. Consumo de ração (g) em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias.

Dias	Tratamentos			
	controle	quitosana /lactose	quitosana / <i>Brassica olearaceae</i>	quitosana/ <i>Aloe vera</i>
5	114,8 ± 2,2	118,8 ± 4,6	110,0 ± 4,1	118,2 ± 2,9
35	107,4 ± 2,9	106,2 ± 6,3	99,8 ± 15,9	113,2 ± 5,0
65	108,4 ± 2,6	115,6 ± 2,6	108,8 ± 4,9	105,0 ± 5,1
95	102,7 ± 3,7	113,0 ± 7,1	95,7 ± 5,1	101,8 ± 4,7

Resultados expressos em Média ± Erro Padrão da Média, n=5.

4.2.2 Ganho de peso

Os resultados obtidos em ratos demonstram que o ganho de peso foi significativamente menor (99,3%) em 35 dias de tratamento com quitosana/*Brassica olearaceae*, apresentando-se significativamente maior (29,4%) em 95 dias de tratamento com quitosana/*Aloe vera*, quando comparados ao controle (figura 5).

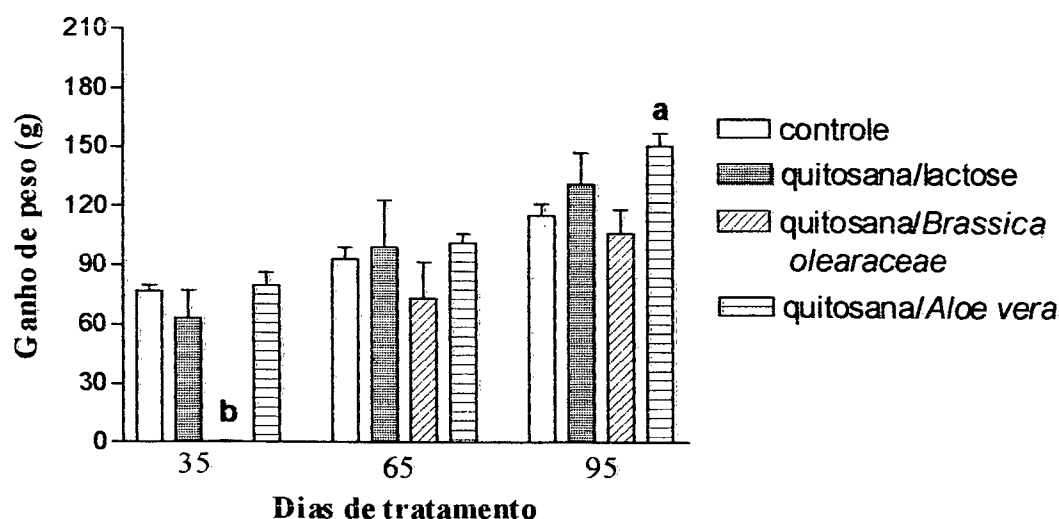


Figura 5. Ganho de peso em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias. (a) diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$); (b) diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$), n=5.

4.2.3 Peso, aspectos anatômicos e patológicos dos órgãos

Quanto ao peso dos órgãos (tabela 8), os resultados obtidos em ratos demonstram que o peso do fígado estava significativamente maior (15%) no tratamento com quitosana/lactose, quando comparado ao controle. Quanto aos aspectos anatômicos e patológicos dos órgãos, não foi observado, macroscopicamente, alguma alteração dos mesmos.

Tabela 8. Peso dos órgãos (g) em ratos submetidos a diferentes tratamentos após 95 dias.

Órgãos	Tratamentos			
	controle	quitosana/lactose	quitosana/ <i>Brassica olearaceae</i>	quitosana/ <i>Aloe vera</i>
Pulmão	1,75 ± 0,07	2,00 ± 0,16	1,68 ± 0,04	1,77 ± 0,02
Coração	1,24 ± 0,02	1,28 ± 0,03	1,15 ± 0,05	1,26 ± 0,05
Fígado	13,68 ± 0,55	16,08 ± 0,71 ^a	13,95 ± 0,26	14,88 ± 0,45
Rins	3,16 ± 0,13	3,23 ± 0,100	2,70 ± 0,13	3,02 ± 0,10
Baço	1,03 ± 0,06	1,07 ± 0,07	0,81 ± 0,09	0,84 ± 0,11

Resultados expressos em Média ± Erro Padrão da Média.

(a) diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), $n=5$.

4.2.4 Níveis séricos de glicose

Em relação aos níveis séricos de glicose os resultados obtidos em ratos demonstram que os mesmos estavam significativamente menores em 35 dias de tratamento com quitosana/lactose (31%), com quitosana/*Brassica olearaeae* (37%), com quitosana/*Aloe vera* (32%) e em 95 dias de tratamento com quitosana/lactose (26%), com quitosana/*Brassica olearaeae* (26%) e com quitosana/*Aloe vera* (9%), quando comparados ao controle nos mesmos tempos de tratamento (figura 6a).

Entretanto, quando comparados ao início do tratamento (figura 6b), os níveis séricos de glicose apresentaram-se significativamente aumentados em 35 dias (27%) e em 95 dias (66%) de tratamento no grupo controle, bem como, em 65 dias de tratamento

com quitosana/lactose (48%) e em 95 dias de tratamento com quitosana/*Aloe vera* (50%).

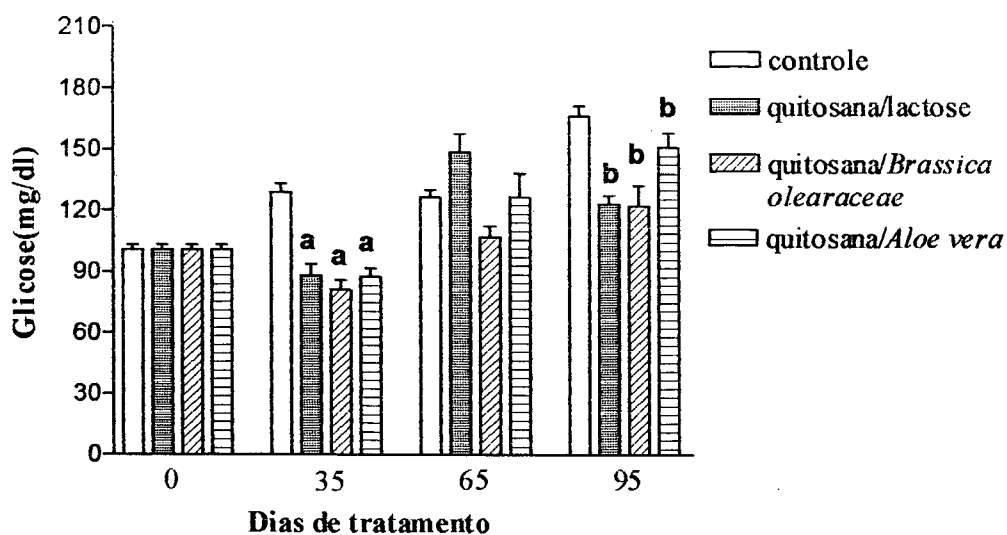


Figura 6a. Análise comparativa dos níveis séricos de glicose em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao controle. (a) diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$); (b) diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$), $n=5$.

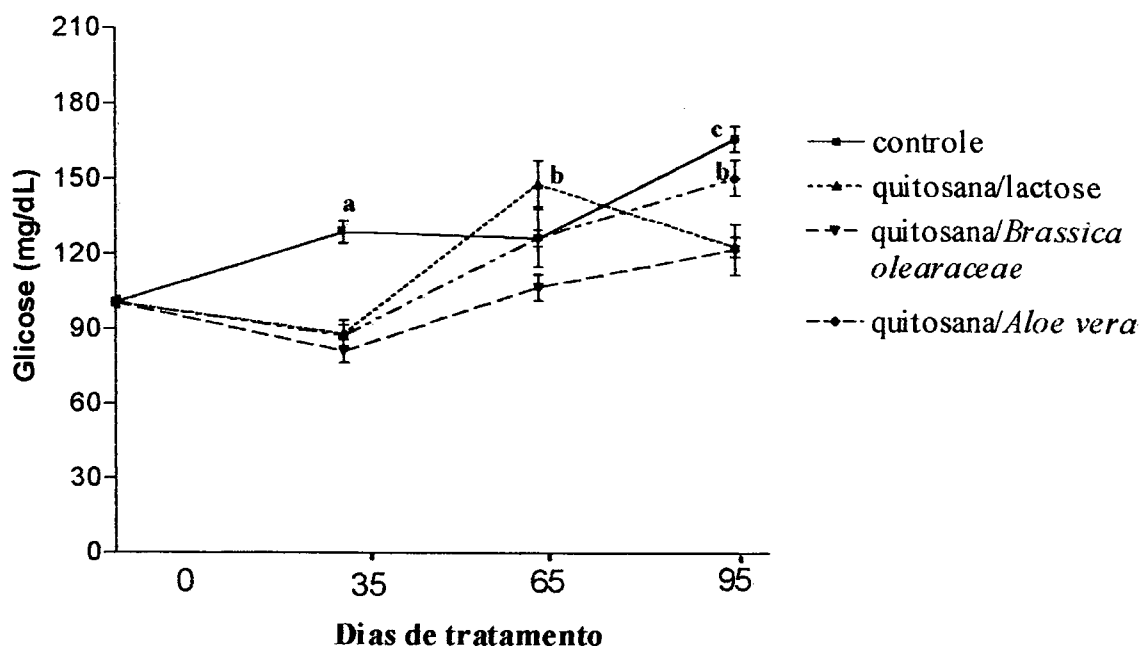


Figura 6b. Análise comparativa dos níveis séricos de glicose em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao início do tratamento. (a) diferença significativa em relação o início do tratamento ($p < 0,05$); (b) diferença significativa em relação ao início do tratamento ($p < 0,01$); (c) diferença significativa em relação ao início do tratamento ($p < 0,001$), $n=5$.

4.2.5 Atividade da fosfatase alcalina

Quanto à atividade da fosfatase alcalina, os resultados obtidos em ratos demonstram que a mesma estava significativamente maior em 35 dias de tratamento com quitosana/*Brassica olearaceae* (55%), apresentando-se significativamente menor em 65 dias de tratamento com quitosana/*Aloe vera* (40%) e em 95 dias de tratamento com quitosana/lactose (27%), com quitosana/*Brassica olearaceae* (51%) e com quitosana/*Aloe vera* (46%), quando comparados ao grupo controle nos mesmos tempos de tratamento (figura 7a).

Quando comparado ao início do tratamento a atividade da fosfatase alcalina se mostrou significativamente maior (64%) em 95 dias de tratamento no grupo controle (figura 7b).

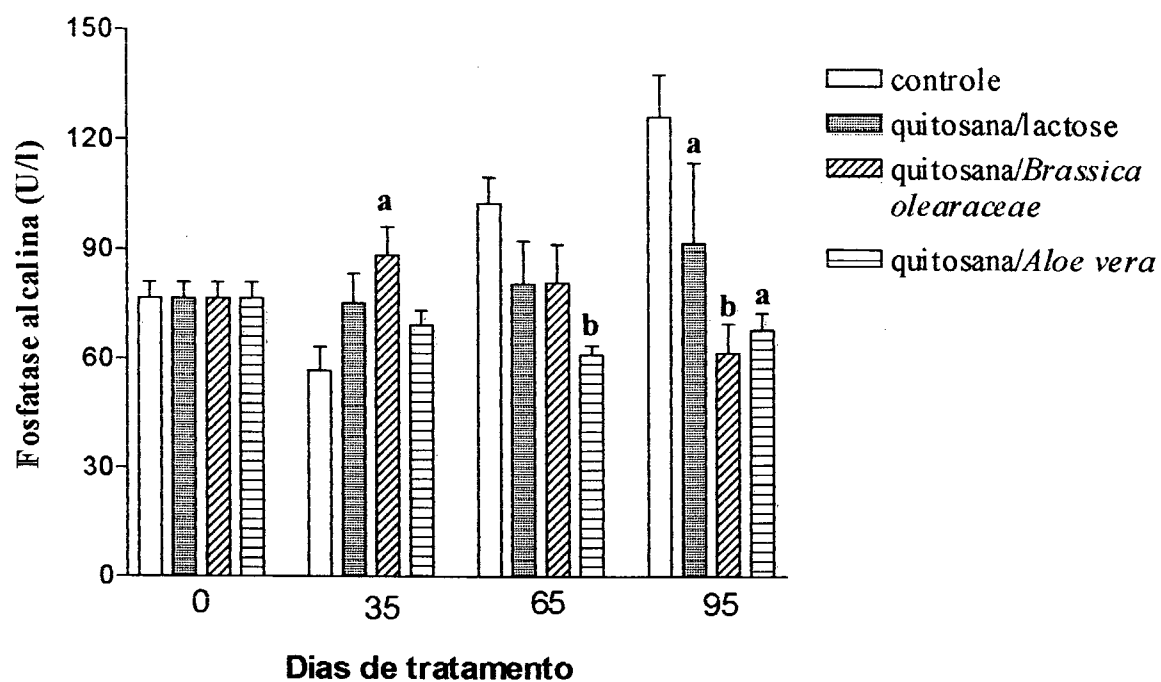


Figura 7a. Análise comparativa da atividade da fosfatase alcalina em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao controle. (a) diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$); (b) diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$), $n=5$.

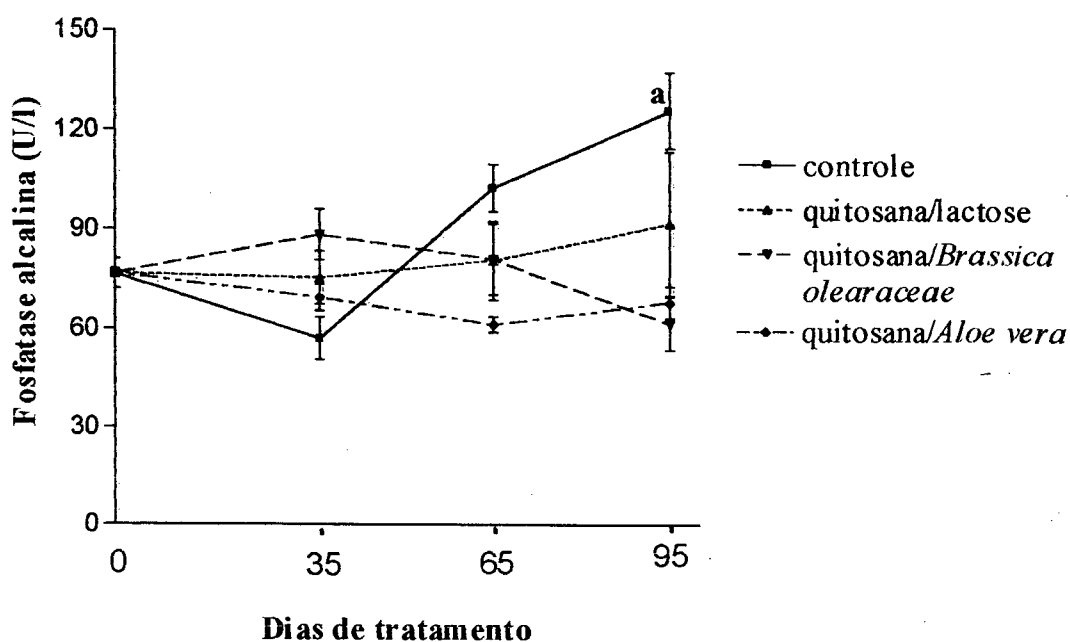


Figura 7b. Análise comparativa da atividade da fosfatase alcalina em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao início do tratamento. (a) diferença significativa em relação ao início do tratamento ($p < 0,01$), $n=5$.

4.2.6 Níveis séricos de colesterol total

Em relação aos níveis séricos de colesterol total, os resultados obtidos em ratos demonstram que os mesmos estavam significativamente menores (36,9%) em 35 dias de tratamento com quitosana/*Brassica olearaceae*, quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo de tratamento (figura 8a).

Quando comparado ao início do tratamento, os níveis séricos de colesterol estavam significativamente menores em 35 dias de tratamento com quitosana/*Brassica olearaceae* (figura 8b).

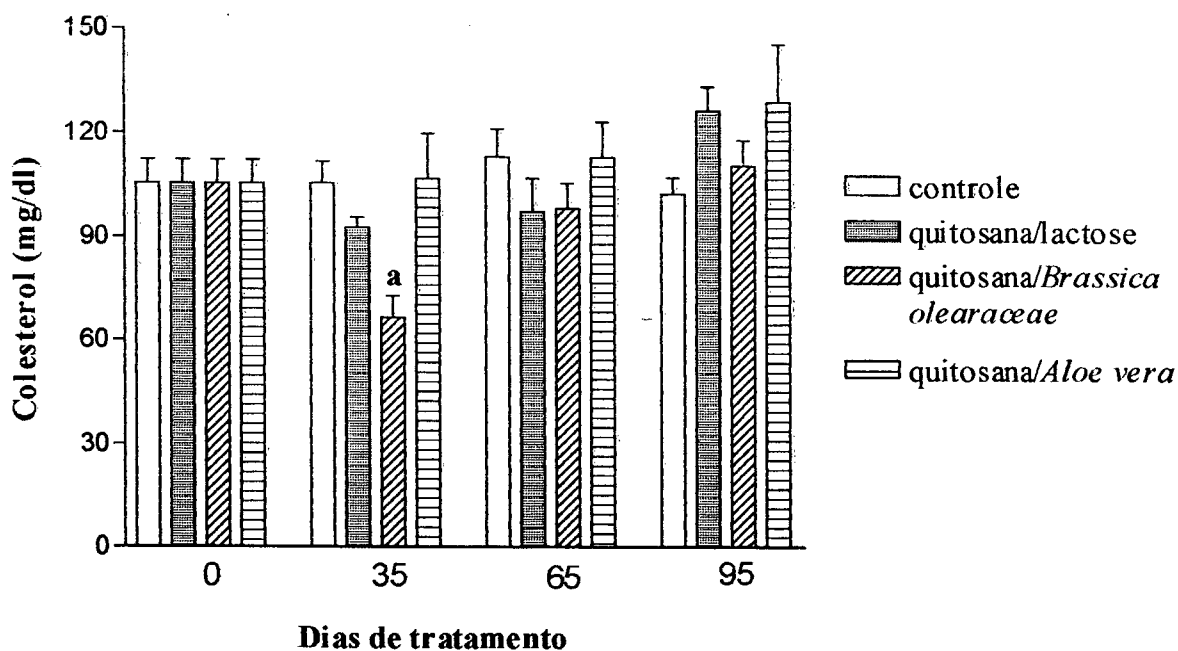


Figura 8a. Análise comparativa dos níveis séricos de colesterol total em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao controle. (a) diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$), $n = 5$.

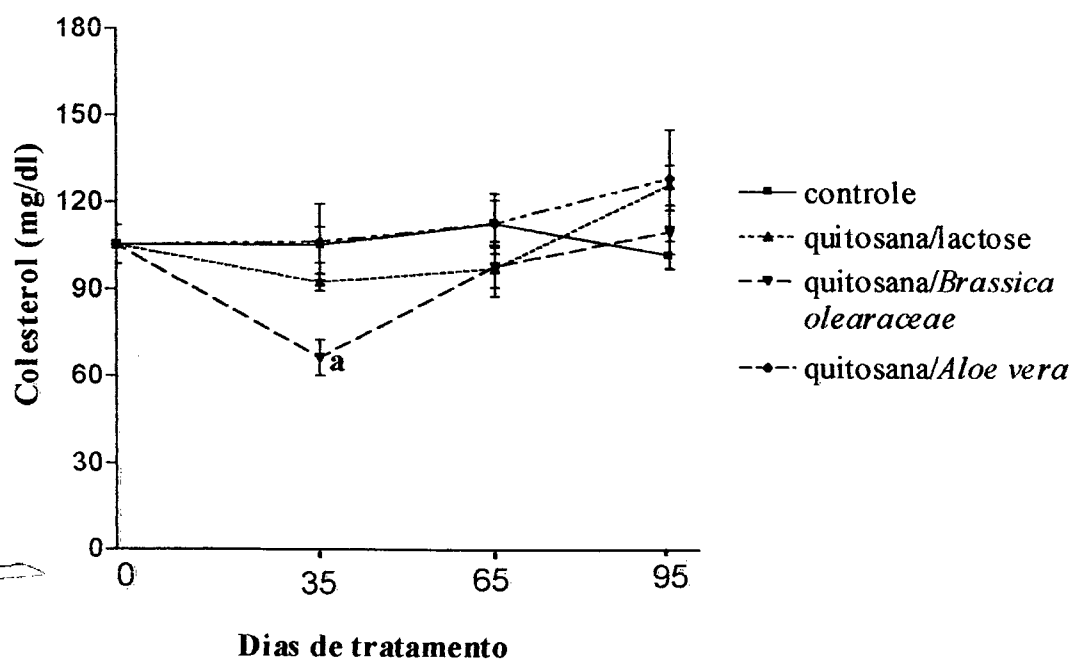


Figura 8b. Análise comparativa dos níveis séricos de colesterol total em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao início do tratamento. (a) diferença significativa em relação ao início do tratamento ($p < 0,01$), $n = 5$.

4.2.7 Níveis séricos de HDL-colesterol

Quanto aos níveis séricos de HDL-colesterol, os resultados obtidos em ratos demonstram que os mesmos estavam significativamente maiores em 35 dias (31,6%) e em 65 dias (39,5%) de tratamento com quitosana/lactose, bem como, em 35 dias (42,3%) e 65 dias (52,5%) de tratamento com quitosana/*Aloe vera*, quando comparados ao controle nos mesmos tempos de tratamento (figura 9a).

Quando comparado ao início do tratamento, os níveis séricos de HDL-colesterol se mostraram significativamente maiores em 35 dias (55%) e 65 dias (78%) de tratamento com quitosana/*Aloe vera* (figura 9b).

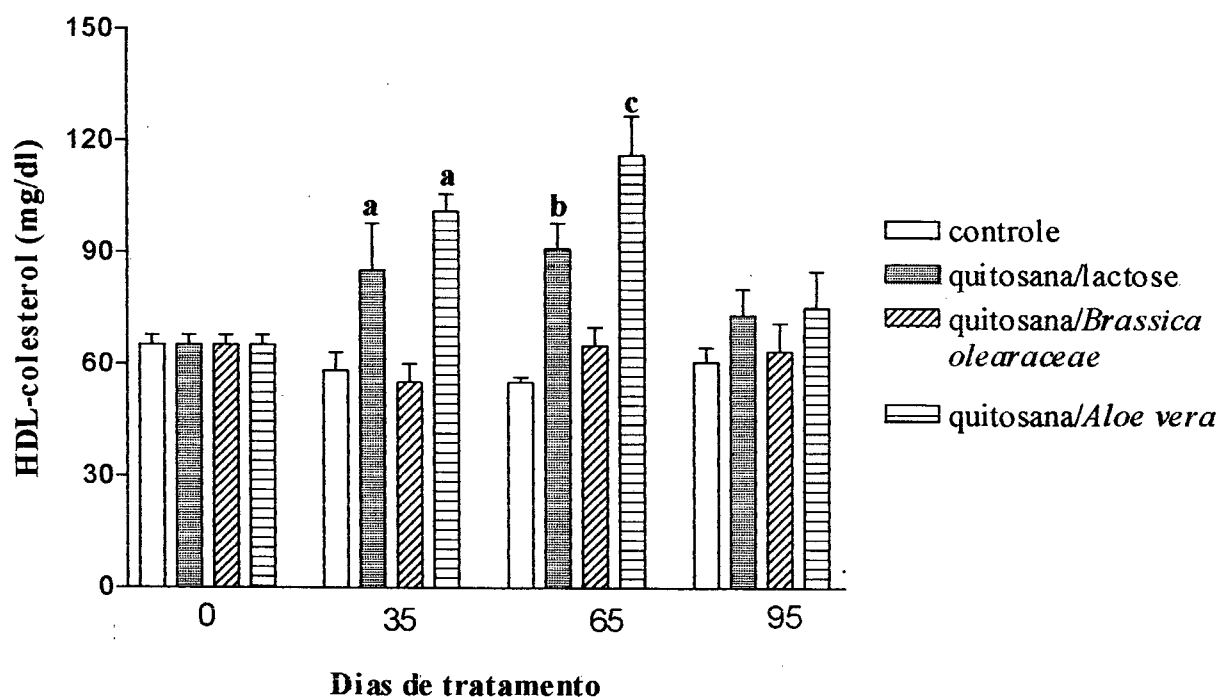


Figura 9a. Análise comparativa dos níveis séricos de HDL-colesterol em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao controle. (a) diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$); (b) diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$); (c) diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,001$), $n=5$.

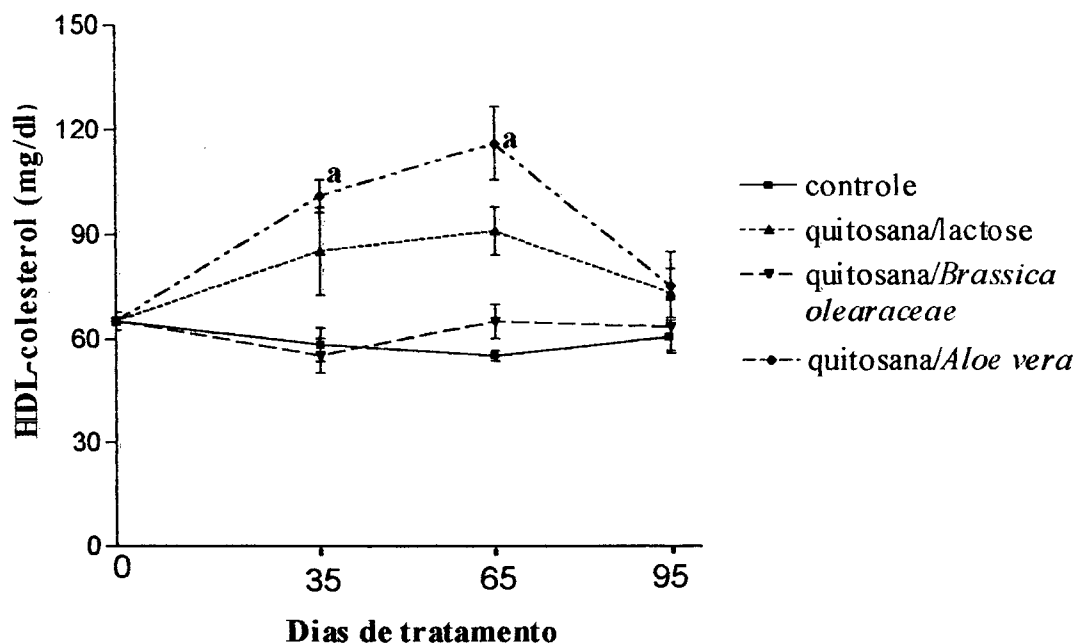


Figura 9b. Análise comparativa dos níveis séricos de HDL-colesterol em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao início do tratamento. (a) diferença significativa em relação ao início do tratamento ($p < 0,05$), $n = 5$.

4.2.8 Concentrações calculadas de LDL-colesterol e VLDL-colesterol

Em relação aos níveis séricos de LDL-colesterol, calculados através da equação de Friedewald, os resultados obtidos em ratos demonstram que os mesmos se apresentaram significativamente menores em 35 dias de tratamento com quitosana/lactose (95%), com quitosana/*Brassica olearaceae* (78%) e com quitosana/*Aloe vera* (83%), bem como, em 65 dias de tratamento com quitosana/lactose (74%), com quitosana/*Brassica olearaceae* (62%) e com quitosana/*Aloe vera* (63%), quando comparados ao grupo controle nos mesmos tempos de tratamento (figura 10a).

Quando comparado ao início do tratamento (figura 10b), os níveis séricos de LDL-colesterol se apresentaram significativamente diminuídos em 35 dias (94%) e 65 dias (53%) de tratamento com quitosana/lactose, bem como, em 35 dias de tratamento com quitosana/*Brassica olearaceae* (73%) e com quitosana/*Aloe vera* (79%), além de

apresentarem-se significativamente aumentados em 65 dias de tratamento no grupo controle (86%) e em 95 dias de tratamento com quitosana/lactose (56%).

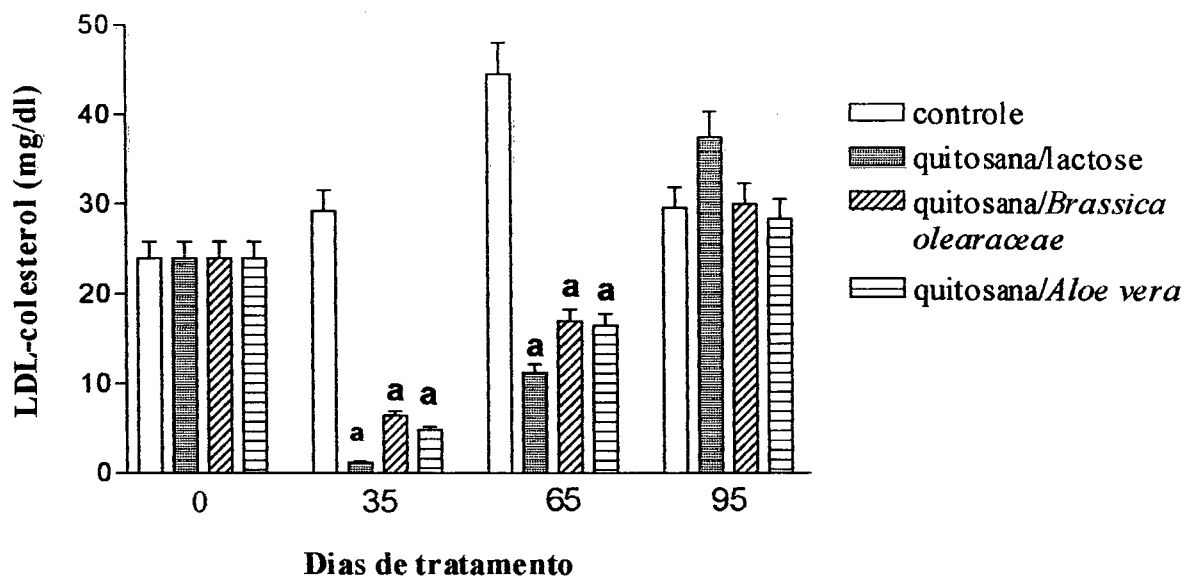


Figura 10a. Análise comparativa dos níveis séricos de LDL-colesterol em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao controle. (a) diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,001$), $n=5$.

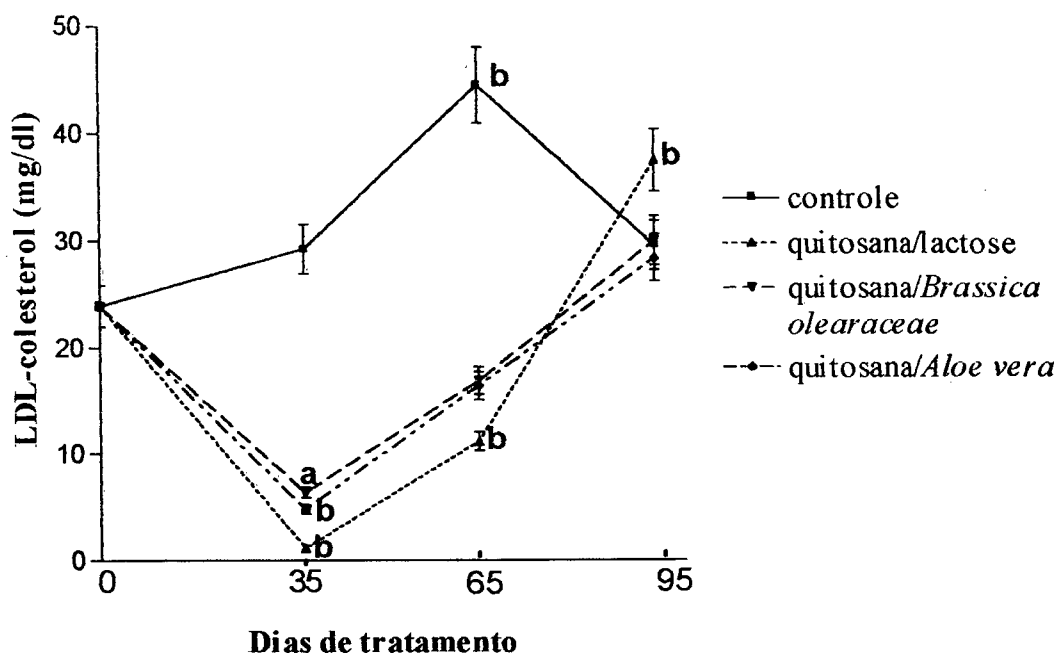


Figura 10b. Análise comparativa dos níveis séricos de LDL-colesterol em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao início do tratamento. (a) diferença significativa em relação ao início do tratamento ($p < 0,05$); (b) diferença significativa em relação ao início do tratamento ($p < 0,001$), $n=5$.

Em relação aos níveis séricos de VLDL-colesterol, calculados através da equação de Friedewald, os resultados obtidos em ratos demonstram que os mesmos estavam significativamente menores em 35 dias de tratamento com quitosana/lactose (51%), com quitosana/*Brassica olearaceae* (72%) e com quitosana/*Aloe vera* (42%), bem como, apresentando-se significativamente maiores (107%) em 95 dias de tratamento com quitosana/*Aloe vera*, quando comparados ao controle nos mesmos tempos de tratamento (figura 11a).

Quando comparado ao início do tratamento (figura 11b), os níveis séricos de VLDL-colesterol apresentaram-se significativamente diminuídos em 35 dias de tratamento com quitosana/lactose (47%) e com quitosana/*Brassica olearaceae* (69%), estando, porém, significativamente aumentados (53%) em 95 dias de tratamento com quitosana/*Aloe vera*.

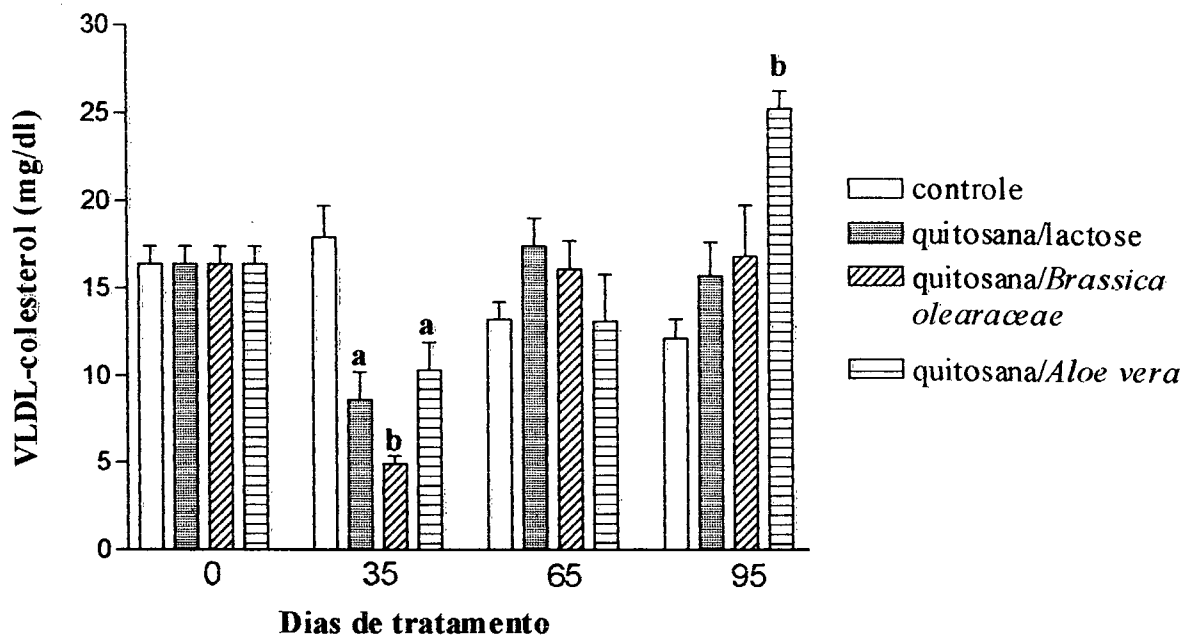


Figura 11a. Análise comparativa dos níveis séricos de VLDL-colesterol em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao controle. (a) diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$); (b) diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,001$), $n=5$.

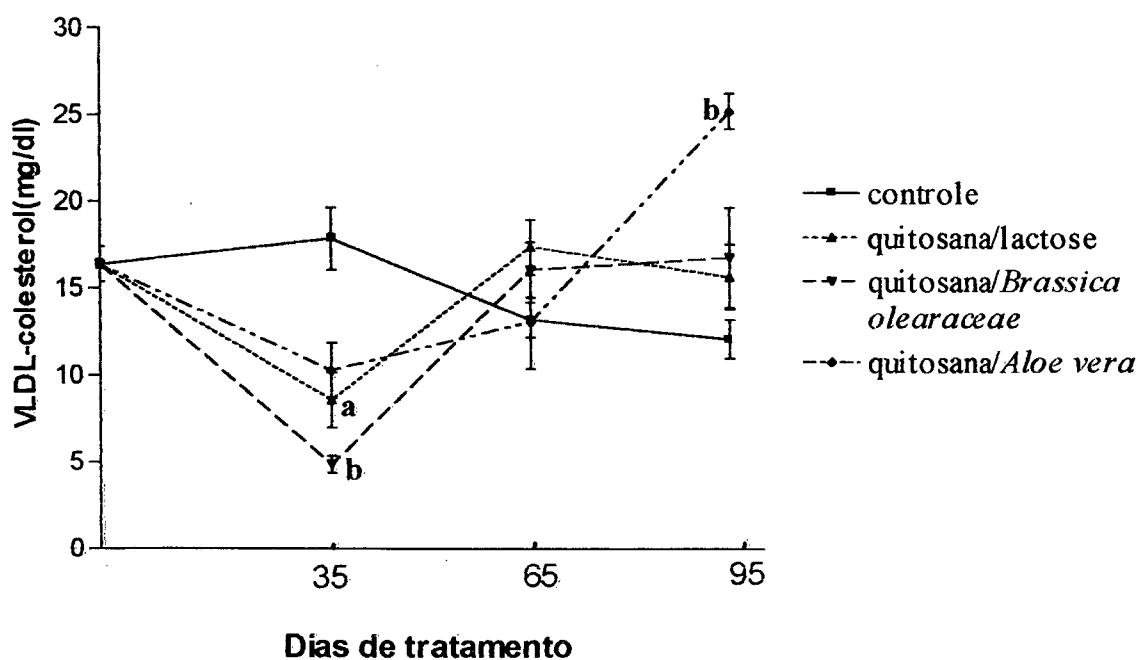


Figura 11b. Análise comparativa dos níveis séricos de VLDL-colesterol em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao início do tratamento. (a) diferença significativa em relação ao início do tratamento ($p < 0,05$); (b) diferença significativa em relação ao início do tratamento ($p < 0,01$), $n=5$.

4.2.9 Níveis séricos de triglicerídeos

Quanto aos níveis séricos de triglicerídeos, os resultados obtidos em ratos demonstram que os mesmos estavam significativamente menores em 35 dias de tratamento com quitosana/lactose (51%), com quitosana/*Brassica olearaceae* (72%) e com quitosana/*Aloe vera* (42%), bem como, apresentando-se significativamente maiores (107%) em 95 dias de tratamento com quitosana/*Aloe vera*, quando comparados ao controle nos mesmos tempos de tratamento (figura 12a).

Quando comparado ao início do tratamento (figura 12b), os níveis séricos de triglicerídeos apresentaram-se significativamente diminuídos em 35 dias de tratamento com quitosana/lactose (47%) e com quitosana/*Brassica olearaceae* (69%), estando, porém, significativamente aumentados (53%) em 95 dias de tratamento com quitosana/*Aloe vera* (figura 12b).

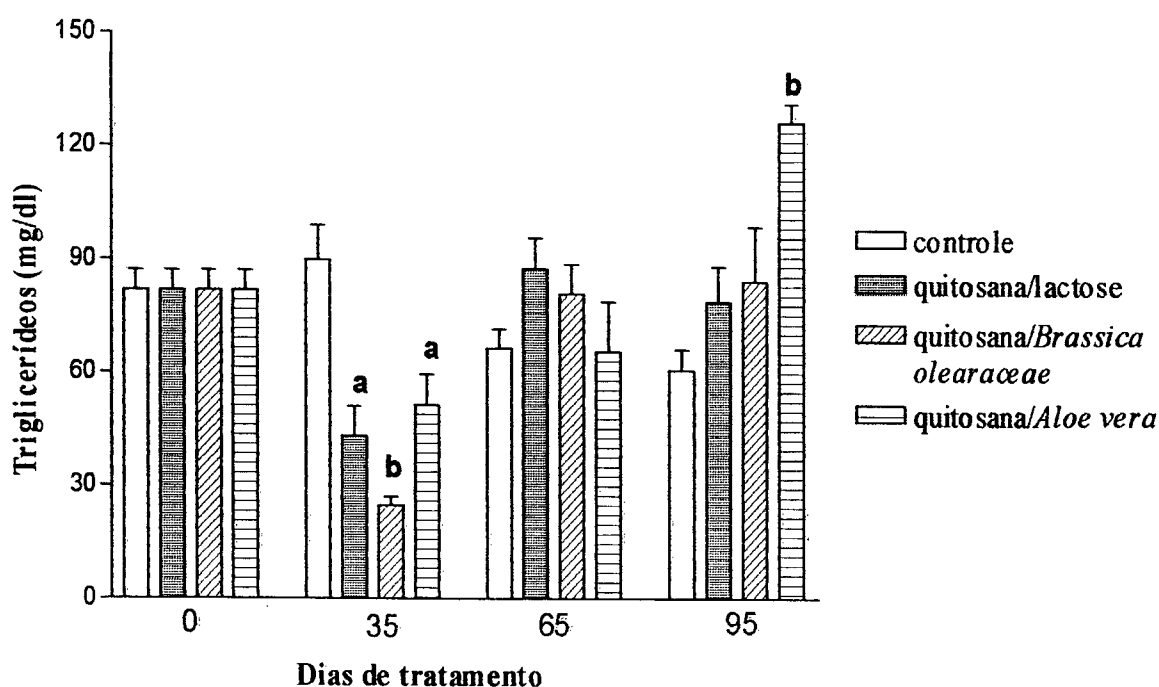


Figura 12a. Análise comparativa dos níveis séricos de triglicerídeos em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao controle. (a) diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$); (b) diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,001$), $n=5$.

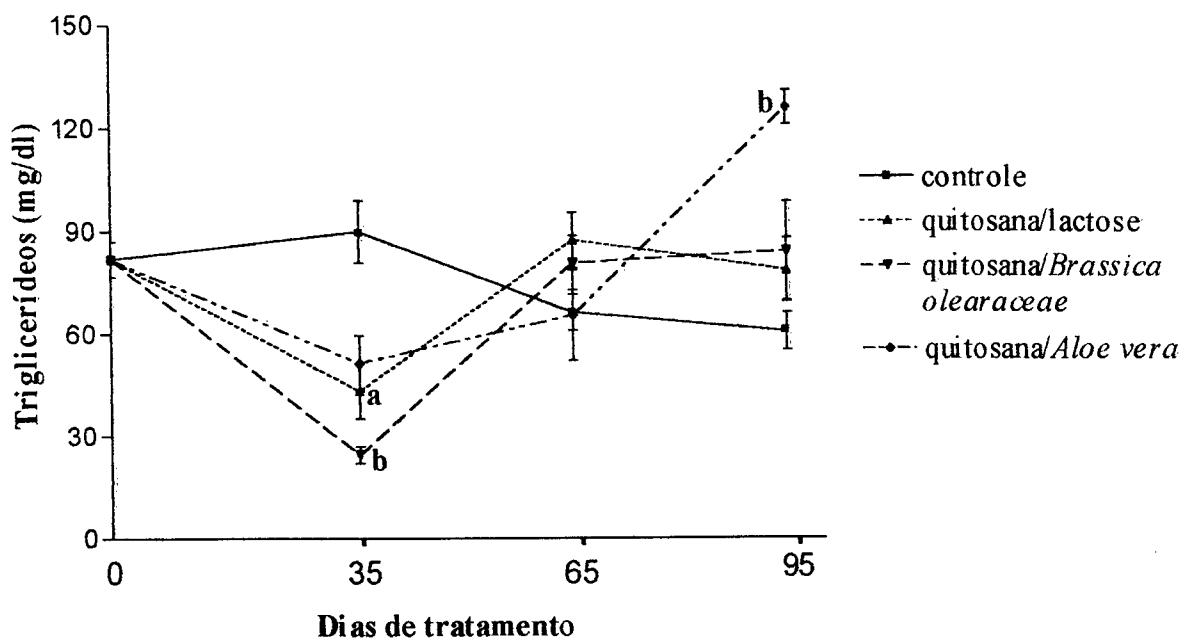


Figura 12b. Análise comparativa dos níveis séricos de triglicerídeos em ratos submetidos a diferentes tratamentos durante 95 dias em relação ao início do tratamento. (a) diferença significativa em relação ao início do tratamento ($p < 0,05$); (b) diferença significativa em relação ao início do tratamento ($p < 0,01$), $n = 5$.

4.3 ENSAIOS CLÍNICOS FASE II

4.3.1 Características da amostragem

Após ter-se efetuado o processo de seleção dos pacientes, respeitando-se os critérios de inclusão/exclusão, os resultados demonstram que foram selecionados 102 pacientes, os quais foram agrupados em 4 diferentes tratamentos (tabela 9).

Tabela 9. Número de pacientes submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias e percentual de desistência ao final do tratamento.

Tratamento	Número de Pacientes			Desistência (%)
	Início	30 dias	60 dias	
lactose (placebo)	28	18	3	89
quitosana/lactose	22	18	4	82
quitosana/ <i>Aloe vera</i>	23	15	7	70
quitosana/ <i>Brassica olearaceae</i>	29	11	3	90

Em relação ao processo de adesão aos diferentes tratamentos (tabela 9), os resultados demonstram que, dos 102 pacientes que iniciaram o tratamento, 50,9% permaneceram até o período de 30 dias de tratamento e 15,6% permaneceram até o período de 60 dias de tratamento.

Quanto às justificativas da desistência ao tratamento, os resultados demonstram que 17 pacientes (16,6%) alegaram constipação, 5 pacientes (4,9%) alegaram “mal estar”, 2 pacientes (1,9 %) alegaram quadros de diarreia, sendo que os demais pacientes (76,6%) alegaram motivos pessoais ou não justificaram a desistência. O significativo número de desistência também estaria associado à expectativa, por parte dos pacientes, da redução imediata de peso, o que não se efetivou, levando ao abandono do tratamento antes do tempo previsto.

Entre os pacientes que alegaram constipação, “mal estar” e diarreia (tabela 10), os resultados demonstram que dos 17 pacientes que apresentaram constipação, 29,4% estavam sendo tratados com placebo, 47% com quitosana/lactose, 5,8% com quitosana/*Aloe vera* e 17,6 % com quitosana/*Brassica olearaceae*. Dos 5 pacientes que alegaram “mal estar”, 20% estava sendo tratados com placebo, 20% com quitosana/lactose, 20% com quitosana/*Aloe vera* e 40% com quitosana/*Brassica olearaceae*. Dos 2 pacientes que apresentaram diarreia, ambos estavam sendo tratados com placebo.

Tabela 10. Número de desistências aos diferentes tratamentos e respectivas justificativas

Tratamento	Justificativas		
	Constipação	“Mal estar”	Diarreia
Lactose (placebo)	5	1	2
Quitosana/lactose	8	1	0
Quitosana/ <i>Aloe vera</i>	1	1	0
Quitosana/ <i>Brassica olearaceae</i>	3	2	0

Para fins de análise e discussão dos resultados dos ensaios clínicos fase II, foram considerados somente os pacientes que permaneceram no período de 30 dias ou até 60 dias de tratamento, cujos dados estão presentes na tabela 11.

Tabela 11. Dados dos pacientes submetidos aos diferentes tratamentos durante 30 e 60 dias.

Tratamento	Nº de pacientes	Sexo		Idade (anos)	Peso (Kg)
		M	F		
Lactose (placebo)	18	3	15	51 ± 3 (n=7)	71 ± 7 (n=6)
quitosana/lactose	18	9	9	58 ± 2 (n=16)	70 ± 3 (n=17)
quitosana/ <i>Aloe vera</i>	15	5	10	46 ± 6 (n=7)	74 ± 5 (n=11)
quitosana/ <i>Brassica olearaceae</i>	11	2	9	48 ± 2 (n=10)	78 ± 6 (n=11)

Idade e Peso expresso em Média ± Erro Padrão da Média; M= masculino, F= feminino

4.3.2 Níveis séricos de glicose

Em relação aos níveis séricos de glicose (tabela 12), os resultados obtidos nos ensaios clínicos demonstram que os mesmos não apresentaram diferença significativa em 30 e 60 dias com os diferentes tratamentos, quando comparados ao grupo placebo nos mesmos tempos de tratamento.

Da mesma forma, não houve diferença significativa no início, em 30 e 60 dias de tratamento com quitosana e associações, quando comparados ao início do tratamento.

Tabela 12. Níveis séricos de glicose (mg/dl) em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias.

Dias	Tratamentos			
	placebo	quitosana/ lactose	quitosana/ <i>Aloe vera</i>	quitosana/ <i>Brassica olearaceae</i>
0	96,3 ± 7,5 (n= 18)	102,5 ± 12,1 (n=14)	62,2 ± 10,7 (n=14)	105,0 ± 24,4 (n=11)
30	76,8 ± 11,6 (n=18)	103,8 ± 15,2 (n=15)	75,2 ± 6,0 (n=14)	127,5 ± 28,9 (n=11)
60	133,6 ± 44,8 (n=3)	110,7 ± 12,5 (n=4)	77,4 ± 12,8 (n=6)	145,0 ± 46,9 (n=3)

Resultados expressos em Média ± Erro Padrão da Média.

4.3.3 Atividade da fosfatase alcalina

Quanto à atividade da fosfatase alcalina, os resultados obtidos nos ensaios clínicos demonstram que não houve diferença significativa no início, em 30 e 60 dias de

tratamento com quitosana e associações, quando comparados ao grupo placebo nos mesmos tempos de tratamento.

Quando comparado ao início do tratamento (figura 13), a atividade da fosfatase alcalina estava significativamente aumentada em 30 dias (33,7%) e em 60 dias (58,2%) de tratamento com quitosana/lactose.

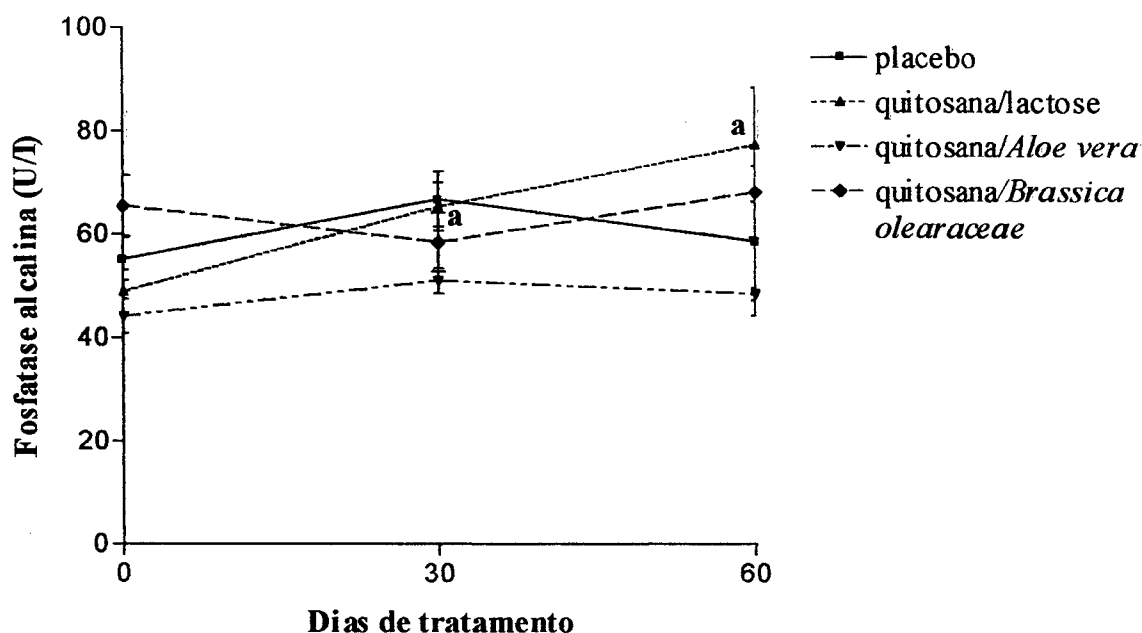


Figura 13. Análise comparativa da atividade da fosfatase alcalina em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias em relação ao início do tratamento. (a) diferença significativa em relação ao início do tratamento ($p < 0,05$), $n=14$ em 30 dias, $n=4$ em 60 dias.

4.3.4 Níveis séricos de colesterol total

Em relação aos níveis séricos de colesterol total, os resultados obtidos nos ensaios clínicos demonstram que os mesmos estavam significativamente maiores (20,5%) no início do tratamento com quitosana/lactose, quando comparado ao grupo placebo no mesmo tempo de tratamento. Os níveis de colesterol total apresentaram-se significativamente menores (24,8%) em 30 dias de tratamento com quitosana/Aloe vera, quando comparado com o grupo placebo no mesmo tempo de tratamento (figura 14a).

Quando comparado ao início do tratamento (figura 14b), os resultados obtidos demonstram que os mesmos estavam significativamente diminuídos em 30 dias (29,5%) e em 60 dias (36,7%) de tratamento com quitosana/lactose, bem como, em 30 dias de tratamento com quitosana/*Aloe vera* (23,3%).

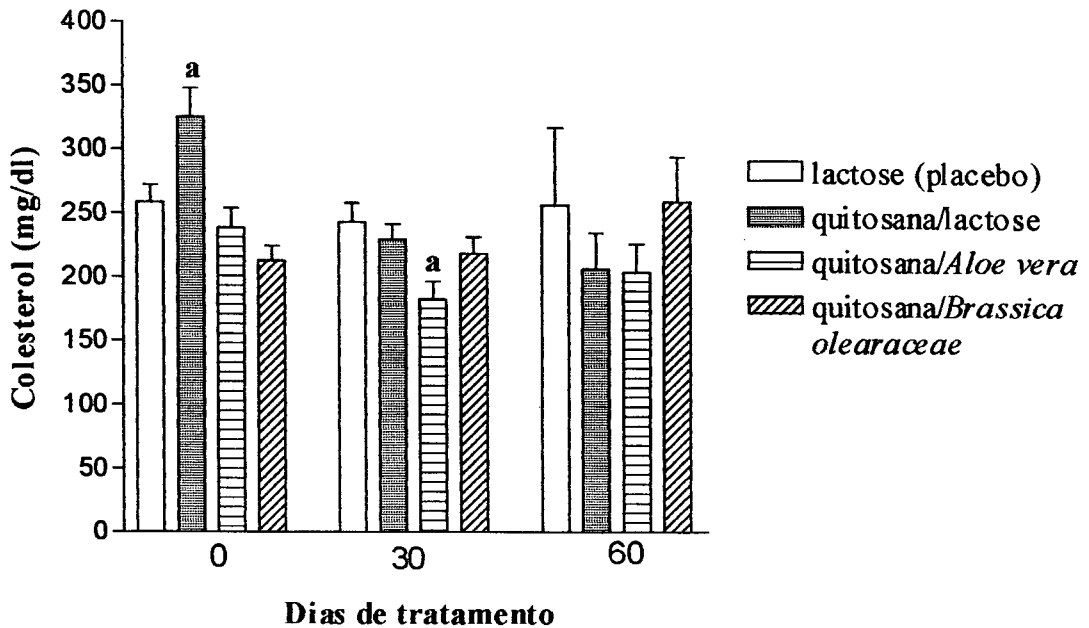


Figura 14a. Análise comparativa dos níveis séricos de colesterol total em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias em relação ao placebo. (a) diferença significativa em relação ao placebo ($p < 0,05$), $n = 16$ (início), $n = 15$ (30 dias).

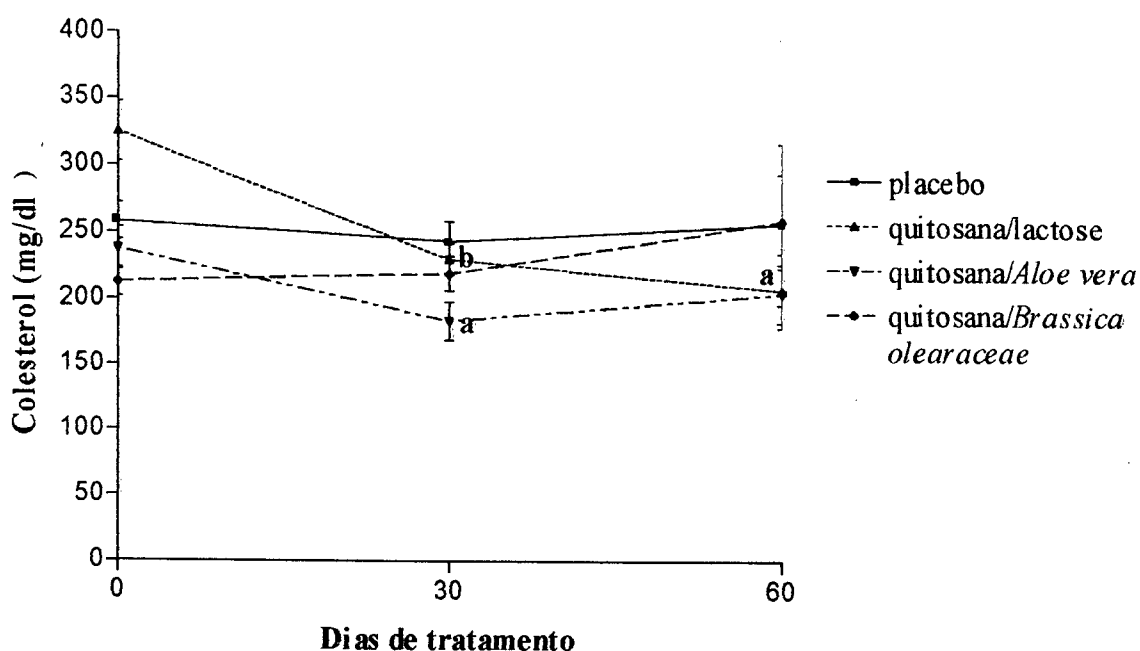


Figura 14b. Análise comparativa dos níveis séricos de colesterol total em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias em relação início do tratamento. (a) diferença significativa em relação ao início do tratamento ($p < 0,05$); (b) diferença significativa em relação ao início do tratamento ($p < 0,01$), $n=18$.

4.3.5 Níveis séricos de HDL-colesterol

Quanto aos níveis séricos de HDL-colesterol (tabela 13), os resultados obtidos nos ensaios clínicos demonstram que não houve diferença significativa em 30 e 60 dias dos diferentes tratamentos, quando comparados ao placebo nos mesmos tempos de tratamento. Da mesma forma, não houve diferença significativa dos grupos tratados com quitosana e associações, quando comparados ao início do tratamento.

Tabela 13. Níveis séricos de HDL-colesterol (mg/dl) em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias.

Dias	Tratamentos			
	placebo	quitosana/lactose	quitosana/ <i>Aloe vera</i>	quitosana/ <i>Brassica olearaceae</i>
0	66,4 ± 8,6 (n= 18)	69,8 ± 7,9 (n=18)	61,7 ± 6,6 (n=15)	41,7 ± 6,2 (n=11)
30	62,1 ± 5,3 (n=18)	66,3 ± 7,7 (n=18)	49,5 ± 4,7 (n=15)	59,1 ± 9,7 (n=11)
60	57,3 ± 2,5 (n=3)	31,6 ± 4,9 (n=4)	59,4 ± 10,3 (n=7)	23,6 ± 11,0 (n=3)

Resultados expressos em Média ± Erro Padrão da Média

4.3.6 Concentrações calculadas de LDL-colesterol e VLDL-colesterol

Em relação aos níveis séricos de LDL-colesterol (figura 15a), calculados através da equação de Friedewald, os resultados obtidos nos ensaios clínicos demonstram que os mesmos se apresentaram significativamente maiores (28,5%) no início do tratamento com quitosana/lactose, quando comparado ao grupo placebo no mesmo tempo de tratamento.

Quando comparados ao início do tratamento (figura 15b), os resultados obtidos demonstram que os níveis de LDL-colesterol estavam significativamente diminuídos em 30 dias (41,8%) e em 60 dias (43,1%) de tratamento com quitosana/lactose, bem como, em 30 dias (24,1%) de tratamento com quitosana/*Aloe vera*.

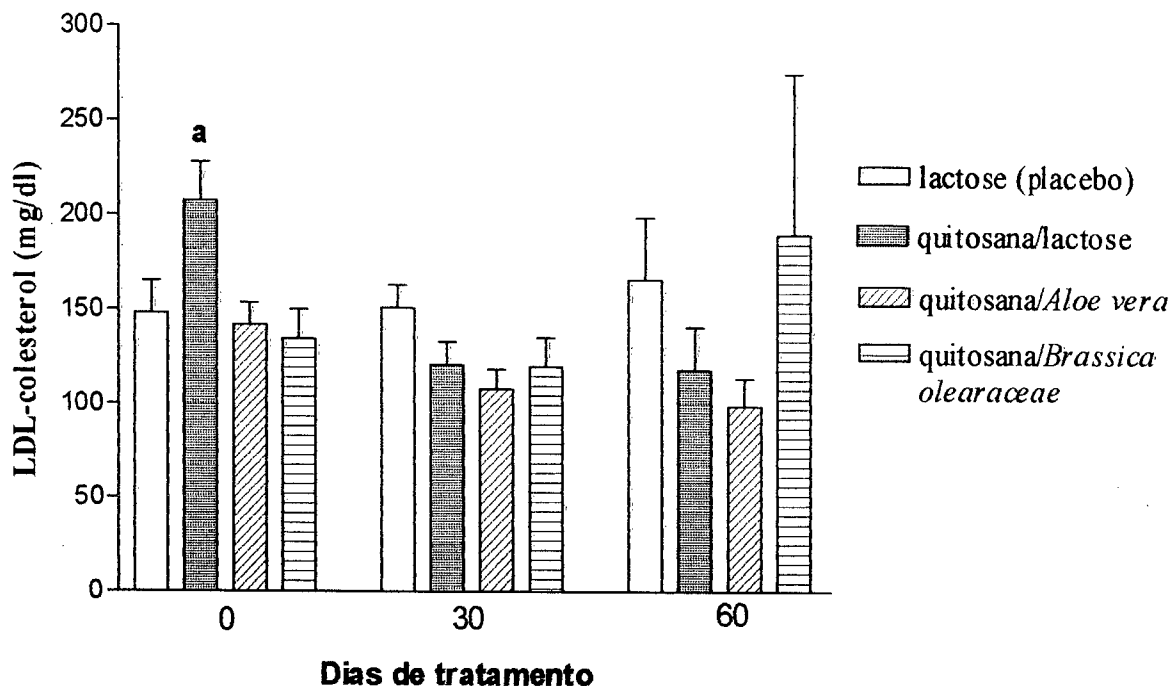


Figura 15a. Análise comparativa dos níveis séricos de LDL-colesterol em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias em relação ao placebo. (a) diferença significativa em relação ao placebo ($p < 0,05$), $n = 18$.

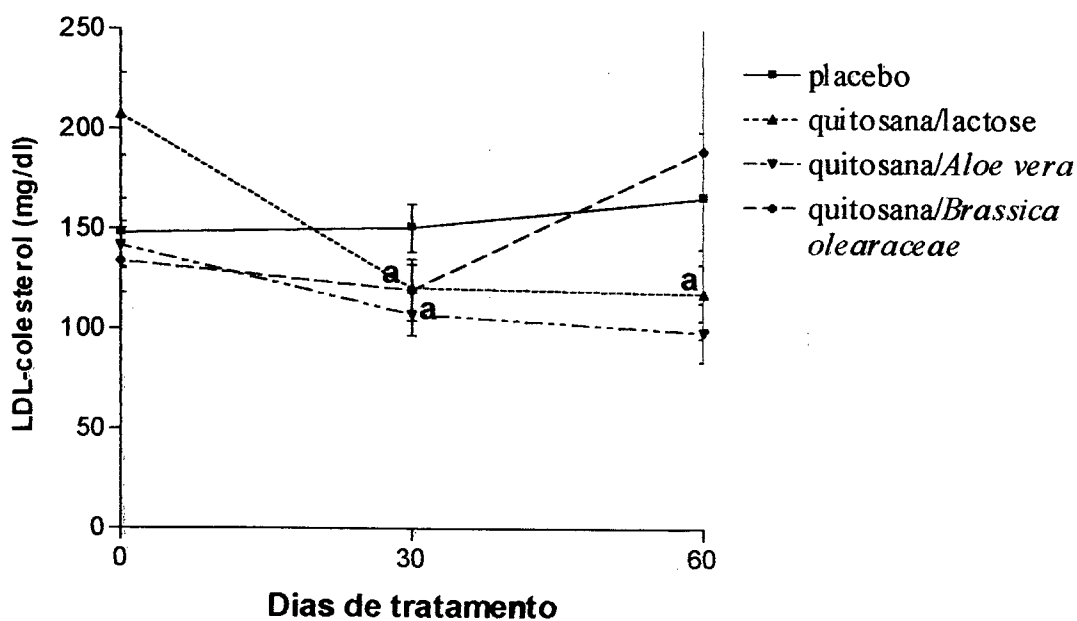


Figura 15b. Análise comparativa dos níveis séricos de LDL-colesterol em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias em relação ao início do tratamento. (a) diferença significativa em relação ao início do tratamento ($p < 0,05$), $n = 18$ em 30 dias e $n = 4$ em 60 dias com chitosana/lactose, $n = 15$ em 30 dias com chitosana/Aloe vera.

Em relação aos níveis séricos de VLDL-colesterol (tabela 14), os resultados obtidos nos ensaios clínicos demonstram que não houve diferença significativa em 30 e 60 dias dos diferentes tratamentos, quando comparados ao grupo placebo nos respectivos tempos de tratamento. Da mesma forma, não houve diferença significativa dos grupos tratados com quitosana e associações em 30 e 60 dias, quando comparados ao início do tratamento.

Tabela 14. Níveis séricos de VLDL-colesterol (mg/dl) em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias.

Dias	Tratamentos			
	placebo	quitosana/lactose	quitosana/ <i>Aloe vera</i>	quitosana/ <i>Brassica. olearaceae</i>
0	44,0 ± 4,3 (n=18)	48,1 ± 6,3 (n=18)	34,5 ± 6,1 (n=15)	36,9 ± 6,2 (n=11)
30	29,8 ± 2,5 (n=18)	42,3 ± 6,3 (n=18)	25,3 ± 3,5 (n=15)	39,4 ± 6,4 (n=11)
60	32,8 ± 11,1 (n=3)	56,3 ± 16,4 (n=4)	45,6 ± 8,7 (n=7)	45,2 ± 20,2 (n=3)

Resultados expressos em Média ± Erro Padrão da Média

4.3.7 Níveis séricos de triglicerídeos

Quanto aos níveis séricos de triglicerídeos (tabela 15), os resultados obtidos nos ensaios clínicos demonstram que não houve diferença significativa em 30 e 60 dias dos diferentes tratamentos, quando comparados ao grupo placebo nos mesmos tempos de tratamento. Da mesma forma, não houve diferença significativa dos grupos tratados com quitosana e associações em 30 e 60 dias, quando comparados ao início do tratamento.

Tabela 15. Níveis séricos de triglicerídeos em humanos submetidos a diferentes tratamentos durante 60 dias.

Dias	Tratamentos			
	placebo	quitosana/lactose	quitosana/ <i>Aloe vera</i>	quitosana/ <i>Brassica olearaceae</i>
0	220,0 ± 26,3 (n= 18)	240,7 ± 31,3 (n=18)	172,8 ± 30,4 (n=15)	184,8 ± 30,8 (n=11)
30	149,1 ± 12,8 (n=18)	211,6 ± 31,7 (n=18)	126,6 ± 17,7 (n=15)	197,0 ± 31,9 (n=11)
60	164,3 ± 55,5 (n=3)	281,5 ± 82,3 (n=4)	228,1 ± 43,4 (n=7)	226,2 ± 101,2 (n=3)

Resultados expressos em Média ± Erro Padrão da Média

5 DISCUSSÃO

O controle de qualidade em medicamento é imprescindível para que se garanta a efetividade e a segurança terapêutica. Os resultados dos parâmetros físico-químicos (pH, teor de cinzas, teor de umidade, peso molecular) obtidos no controle de qualidade da quitosana e associações estavam em conformidade com os parâmetros apresentados em produtos comerciais similares. O peso médio das cápsulas apresentaram pequena variação, não comprometendo a dose diária das diferentes associações sugerida nos ensaios clínicos. Um grau de desacetilação moderado, bem como, uma massa molar média apresentados pela quitosana estão em conformidade com o sugerido por MUZZARELI (1997), o que conferiria ao polímero uma maior interação aos lipídeos da dieta, com conseqüente diminuição da absorção intestinal e aumento da excreção fecal dos mesmos. Os resultados da análise microbiológica das diferentes associações demonstraram não haver alguma contaminação significativa, garantindo uma maior segurança e efetividade aos diferentes tratamentos.

Em relação aos ensaios pré-clínicos com ratos, os resultados demonstraram que o consumo de água e de ração não se mostraram alterados durante o período de tratamento com a quitosana e associações, o que está em conformidade com os resultados obtidos por SUGANO e colaboradores (1980), muito embora há relatos na literatura que demonstram a influência sobre a digestibilidade e crescimento de camarões suplementados com quitina e quitosana (SHIAU & YU, 1998). Estes resultados, portanto, sugerem que, possivelmente, o tratamento com quitosana e associações a 4% da dieta poderiam exercer sua ação hipolipemiante em ratos sem alterar os parâmetros nutricionais.

Quanto ao ganho de peso em ratos, os resultados demonstram que houve um aumento significativo nos ratos submetidos ao tratamento com quitosana/*Aloe vera* em 95 dias, quando comparados ao grupo controle. Estes resultados diferem dos obtidos por CHIANG e colaboradores (2000) os quais não observaram diferença de ganho de pesos entre ratos suplementados com 5% de quitosana à dieta e o grupo controle. Os ratos submetidos ao tratamento com quitosana/*Brassica olearaceae* apresentaram um ganho de peso significativamente inferior ao grupo controle em 35 dias de tratamento, porém, esta redução poderia estar associada com quadros de diarreia apresentados pelos

mesmos, sendo que, em 65 dias, já passaram a apresentar ganho de peso semelhante ao grupo controle. Estes resultados, portanto, sugerem que, possivelmente, o tratamento com quitosana e associações a 4% da dieta não teria efeito redutor de pesos em ratos.

Em relação aos pesos dos órgãos, os resultados demonstram que não houve diferença significativa nos pesos do pulmão, coração, rins e baço dos ratos submetidos ao tratamento com quitosana e associações, quando comparados ao grupo controle. Entretanto, o fígado estava significativamente maior (15%) no tratamento com quitosana/*Brassica olearaceae*, quando comparada ao grupo controle, ao contrário dos resultados obtidos por CHIANG (2000), que observou significativa diminuição do peso fígados em ratos com dieta suplementada com 5% de quitosana associada. Possivelmente, o peso maior do fígado não estaria associado à lesão hepática, mas sim, a um possível aumento da função hepática, uma vez que, como será observado adiante, os níveis de fosfatase alcalina não sofreram elevação no respectivo grupo. Quanto aos aspectos anatômicos e patológicos dos órgãos, não foi observado, macroscopicamente, alguma alteração dos mesmos. Neste sentido, pode-se sugerir que o tratamento com quitosana e associações a 4% da dieta não acarretaria em lesão ou disfunção tecidual em ratos, oferecendo maior segurança ao tratamento.

Em relação aos níveis séricos de glicose, os resultados obtidos em ratos demonstram que os mesmos estavam significativamente diminuídos em 35 dias de tratamento com a quitosana e associações, quando comparados ao grupo controle nos mesmos tempos de tratamento. Embora os níveis de glicose no tratamento com as diferentes associações não apresentassem diferença significativa em 65 dias de tratamento, novamente os mesmos passaram a apresentar valores menores em 95 dias, quando comparados ao grupo controle nos respectivos tempos de tratamento. Diferente perfil se observa na avaliação tempo-dependente dos níveis de glicose, cujos resultados demonstram que alguns tratamentos não apresentaram diferença significativa ou, até mesmo, apresentaram um aumento significativo dos níveis de glicose, quando comparados ao início do tratamento. Portanto, o que se pode sugerir é que o tratamento com a quitosana e associações a 4% da dieta, possivelmente apresentariam um efeito sobre os níveis de glicose, o que está em conformidade com os resultados obtidos por MIURA e colaboradores (1995), que também observaram a alterações nos níveis de glicose em ratos submetidos ao tratamento com quitosana a 5% da dieta.

Em relação à atividade da fosfatase alcalina, os resultados obtidos em ratos demonstram que, em geral, a mesma estava significativamente diminuída no tratamento com quitosana e associações, quando comparada ao grupo controle nos respectivos tempos de tratamento. Ao se avaliar o efeito tempo-dependente, os resultados demonstram que não houve diferença significativa na atividade da fosfatase alcalina no decorrer dos tratamentos com quitosana e associações, quando comparado ao início do tratamento, apresentando-se significativamente aumentada somente no grupo controle em 95 dias de tratamento. Uma vez que a fosfatase alcalina apresenta-se como um indicador de função hepática e intestinal (PARDINI, 2001), os resultados sugerem que o tratamento com quitosana e associações a 4 % da dieta em ratos não acarretaria em lesão nestes tecidos, já que a sua atividade não sofreu aumento significativo no decorrer do tratamento.

Em relação aos níveis de colesterol total, os resultados obtidos em ratos demonstram que o tratamento com quitosana/*Brassica olearaceae* foi o mais efetivo, sendo capaz de reduzir os níveis de colesterol em 35 dias, quando comparado ao grupo controle no respectivo tempo de tratamento. Semelhante comportamento tem sido descrito na literatura, onde se observou a redução dos níveis de colesterol total em ratos e em camundongos submetidos à dieta suplementada com 5% de quitosana por um período de 3 a 4 semanas (MIURA, 1995; CHIANG, 2000; GALLAHER, 2000). Ao se avaliar o efeito tempo-dependente, os resultados demonstram que houve uma diminuição significativa nos níveis séricos de colesterol total em 35 dias de tratamento com quitosana/*Brassica olearaceae*, quando comparado ao início do tratamento, sendo que o perfil apresentado está em conformidade com o obtido por DOUGLAS e colaboradores (1998), os quais observaram um efeito redutor de colesterol total em ratos após 20 semanas de dieta suplementada com 5% de quitosana. Portanto, os resultados obtidos sugerem que o suplemento com quitosana /*Brassica olearaceae* a 4% da dieta em ratos apresentaria efeito redutor nos níveis de colesterol total, o que poderia contribuir para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares as quais, de acordo com NISHINO e colaboradores (2000), estariam associadas à elevação dos níveis de lipídeos plasmáticos.

Em relação aos níveis de HDL-colesterol, os resultados obtidos em ratos demonstram que o tratamento com quitosana/lactose e quitosana/*Aloe vera* foram os mais efetivos, sendo capazes de aumentar significativamente os níveis de HDL-

colesterol em 35 e 65 dias de tratamento, quando comparado ao grupo controle nos respectivos tempos de tratamento. Ao se avaliar o efeito tempo-dependente da quitosana e associações a 4% da dieta, os resultados demonstram que o tratamento com quitosana/*Aloe vera* foi capaz de aumentar significativamente os níveis de HDL-colesterol em 35 e 65 dias, quando comparado ao mesmo grupo no início do tratamento. Semelhante perfil tem sido relatado na literatura, onde se observou um aumento nos níveis de HDL-colesterol em ratos e aves suplementados com quitosana à dieta (LEHOUXI, 1993; RAZDAN, 1994 e 1996). Tem sido demonstrado que os níveis aumentados de HDL-colesterol tem efeito redutor nos riscos de desenvolvimento de aterosclerose (REAL, 2001). Desta forma, os resultados obtidos em ratos sugerem que o tratamento com quitosana/*Aloe vera* a 4% da dieta, possivelmente contribuiria para a diminuição dos riscos de desenvolvimento desta doença coronariana, uma vez que foi capaz de aumentar os níveis plasmáticos de HDL-colesterol.

Em relação aos níveis de LDL-colesterol, os resultados obtidos em ratos demonstram que os diferentes tratamentos com quitosana e associações a 4% da dieta foi capaz de reduzir os níveis de LDL-colesterol em 35 e 65 dias, quando comparados ao grupo controle nos respectivos tempos de tratamento. Da mesma forma, na avaliação do efeito tempo-dependente, a quitosana e associações foram capazes de diminuir os níveis de LDL-colesterol em 35 e 65 dias quando comparados ao início do tratamento. O efeito redutor da quitosana sobre as LDL-colesterol também tem sido descrito na literatura, onde se observou um decréscimo dos níveis de LDL-colesterol em ratos suplementados com 5% de quitosana à dieta (CHIANG, 2000). Já está bem estabelecido que níveis plasmáticos elevados das LDL-colesterol tem sido implicados na formação da placa aterogênica e conseqüente desenvolvimento de aterosclerose (KADAR & GLASZ, 2001). Desta forma, os resultados obtidos em ratos sugerem que os diferentes tratamentos com quitosana e associações a 4% da dieta poderiam contribuir para a diminuição dos processos aterogênicos, uma vez que foram capazes de provocar a redução dos níveis séricos de LDL-colesterol.

Quanto aos níveis de VLDL-colesterol, os resultados obtidos em ratos demonstram que os diferentes tratamentos com quitosana e associações provocaram uma significativa redução em 35 dias de tratamento, quando comparado ao grupo controle. Ao se avaliar o efeito tempo-dependente da quitosana e associações, os resultados demonstram que o tratamento com quitosana/lactose e quitosana/*Brassica*

olearaceae foram os mais efetivos, sendo capazes de diminuir os níveis de VLDL-colesterol em 35 dias de tratamento, quando comparados ao início do tratamento. Este comportamento está em conformidade com os resultados obtidos por CHIANG e colaboradores (2000), que também observaram a redução de VLDL-colesterol em ratos suplementados 5% de quitosana à dieta. Entretanto, os resultados em ratos demonstram que houve um aumento significativo de VLDL-colesterol em 95 dias de tratamento com quitosana/*Aloe vera*, o que poderia estar associado ao significativo aumento dos níveis de triglicerídeos plasmático observado neste grupo no mesmo período de tratamento, o qual será discutido a seguir. Portanto, os resultados obtidos em ratos sugerem que o tratamento quitosana/lactose e com quitosana/*Brassica olearaceae* a 4% da dieta foram capazes de reduzir os níveis de VLDL-colesterol, o que estaria associado a uma diminuição nos níveis de triglicerídeos e colesterol observados no mesmo tratamento.

Em relação aos níveis de triglicerídeos, os resultados obtidos em ratos demonstram que os diferentes tratamentos com quitosana e associações a 4% da dieta provocaram uma significativa redução nos níveis de triglicerídeos em 35 dias de tratamento, quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo de tratamento. Ao se avaliar o efeito tempo-dependente da quitosana e associações, os resultados demonstram que o tratamento com quitosana/lactose e quitosana/*Brassica olearaceae* foram os mais efetivos, sendo capazes de diminuir os níveis de triglicerídeos em 35 dias de tratamento, quando comparados ao início do tratamento. Este perfil está em conformidade com o obtido por RAZDAN e colaboradores (1994 e 1996), que também observaram a redução de triglicerídeos em ratos suplementados com 4% de quitosana à dieta. Curiosamente, os resultados em ratos demonstram que houve um aumento significativo de triglicerídeos em 95 dias de tratamento quitosana/*Aloe vera*, o que poderia estar associado ao significativo ganho de peso apresentado pelos mesmos no decorrer do tratamento, conforme discutido anteriormente. MEYER e colaboradores (2000) sugerem que, tanto a hipercolesterolemia como a hipertrigliceridemia, seriam fatores de risco importantes para a aterosclerose. Desta forma, os resultados obtidos em ratos sugerem que o tratamento quitosana/lactose e com quitosana/*Brassica olearaceae* a 4% da dieta poderiam contribuir para a diminuição de risco de desenvolvimento de aterosclerose, uma vez que foram capazes de reduzir os níveis de triglicerídeos.

Em resumo, os resultados pré-clínicos em ratos demonstram que o tratamento com quitosana e associações foram capazes de provocar efeitos sobre os parâmetros

bioquímicos avaliados sem, contudo, alterar os parâmetros nutricionais. A alteração dos parâmetros bioquímicos foi mais efetiva em 35 dias de tratamento, podendo-se destacar a redução significativa de colesterol, triglicerídeos, LDL-colesterol e VLDL-colesterol, bem como a elevação significativa de HDL-colesterol, como sendo os resultados mais expressivos. Surpreendentemente, após um período mais prolongado de tratamento, não foi observada uma diferença significativa nestes parâmetros entre os diferentes tratamentos em comparação ao controle, bem como, na avaliação tempo-dependente, o que nos leva a supor que houve uma alteração do metabolismo e/ou maior mobilização de nutrientes de reserva.

Já está bem estabelecido que doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, estão associadas ao aumento dos níveis plasmáticos de lipídeos, principalmente de colesterol, triglicerídeos e LDL-colesterol. Também se tem observado que o risco de incidência destas doenças é menor quando os níveis de HDL-colesterol estão aumentados. Desta forma, uma vez que os diferentes tratamentos com quitosana e associações foram capazes de reduzir os níveis de colesterol, triglicerídeos e LDL-colesterol e aumentarem os níveis de HDL-colesterol, pode-se sugerir os mesmos poderiam contribuir para a prevenção e/ou tratamento de processos aterogênicos.

Especificamente, pode-se observar que o tratamento com quitosana associada à *Brassica olearaceae* foi o mais efetivo, em termos de potencial hipolipemiante em ratos, uma vez que foi capaz de reduzir os níveis de colesterol total, triglicerídeos, LDL-colesterol e VLDL-colesterol.

Em relação aos ensaios clínicos fase II, os resultados do processo de adesão aos diferentes tratamentos demonstram que houve uma significativa desistência até o período de 60 dias de tratamento, sendo que a maioria justificaram o abandono por motivos pessoais ou não justificaram a desistência. Dentre os pacientes que justificaram a desistência, pode-se observar que a principal causa estaria associada ao surgimento de quadros de constipação, seguida da alegação de “mal estar” e de quadros de diarreia, sendo que tais efeitos indesejáveis já haviam sido descritos por ASAOKA e colaboradores (1996), muito embora haja relatos na literatura os quais o tratamento com quitosana não teria provocado efeitos indesejáveis (PITTLER, 1999). Os pacientes que apresentaram menores índices destes efeitos foram os tratados com quitosana/*Aloe vera*, sugerindo-se que este perfil estaria associado a presença de *Aloe vera* na associação, uma vez que, segundo BRUNETON e colaboradores (1995), a mesma tem apresentado

propriedades laxativas pelo aumento do trânsito intestinal, o que poderia contribuir para a diminuição dos transtornos gastrointestinais provocados pela quitosana, podendo, desta forma, ter contribuído para a menor desistência ao tratamento proposto.

Em relação aos níveis séricos de glicose, os resultados obtidos nos ensaios clínicos demonstram que, diferentemente do perfil obtido em ratos, os mesmos não se apresentaram significativamente alterados durante o tratamento com quitosana e associações, quando comparados ao grupo placebo nos mesmos tempos de tratamento ou na avaliação tempo-dependente, sugerindo que as diferentes associações não teriam efeito sobre os níveis de glicose em humanos. Embora alguns valores observados em 60 dias de tratamento se apresentaram acima dos níveis de referência para glicose em humanos (60-109 mg/dl), os mesmos poderiam se justificados pela expressiva redução do número de pacientes, o que dificulta a análise estatística dos resultados.

Em relação à atividade da fosfatase alcalina, os resultados obtidos nos ensaios clínicos fase II demonstram que, embora o tratamento com quitosana/lactose tenha provocado um aumento significativo em 30 e 60 dias em comparação ao início do tratamento, os valores se apresentaram dentro dos limites de referência aceitáveis para este parâmetro (homens ≤ 306 U/l; mulheres ≤ 300 U/l). Também pode-se observar que não houve diferença significativa na atividade da fosfatase alcalina nos pacientes tratados com quitosana e associações, quando comparados ao grupo placebo nos respectivos tempos de tratamento. Desta forma, semelhante aos resultados obtidos em ratos, os resultados em humanos sugerem que o tratamento com quitosana e associações, possivelmente não acarretaria em disfunção ou lesão hepática, uma vez que em ambos os ensaios as atividades da fosfatase alcalina não apresentaram um aumento significativo no decorrer do tratamento, quando comparado ao grupo controle em ratos ou ao placebo em humanos, bem como, na avaliação tempo-dependente.

Quanto aos níveis de colesterol total, os resultados obtidos nos ensaios clínicos fase II demonstram que o tratamento com quitosana/lactose apresentou um efeito hipocolesterolêmico significativo, sendo capaz de provocar um decréscimo de 96,6 mg/dl (2,5 mmol/l) após 30 dias e de 119,5 mg/dl (3,0mmol/l) após 60 dias de tratamento, o que corresponde a uma redução de 29,5% e 36,7%, respectivamente, dos níveis séricos de colesterol total.

O tratamento com quitosana/*Aloe vera* também apresentou um efeito hipocolesterolêmico significativo, sendo capaz de provocar um decréscimo de 55,6

mg/dl (1,4 mmol/l) após 30 dias de tratamento, o que corresponde a uma redução de 23,3% dos níveis séricos de colesterol total. Além disto, o tratamento com quitosana/*Aloe vera* também apresentou uma significativa redução dos níveis de colesterol total após 30 dias de tratamento quando comparado ao grupo placebo no mesmo tempo de tratamento, não sendo observado tal perfil, no tratamento com quitosana/lactose.

Semelhante comportamento tem sido descrito na literatura, onde se observou o efeito hipocolesterolêmico em pacientes tratados com quitosana (MAEZAKI, 1993; JING, 1997), muito embora haja trabalhos que demonstram que o tratamento com quitosana não foi capaz de reduzir significativamente os níveis séricos de colesterol total (PITTLER, 1999; WUOLIJOKI, 1999).

O perfil observado nos ensaios clínicos fase II se mostrou diferente dos resultados obtidos em ratos, cujo tratamento mais efetivo foi o da quitosana/*Brassica olearaceae*, sendo que redução dos níveis de colesterol total foi obtida apenas em 35 dias de tratamento, não se estendendo em um maior prazo como foi observado com nos ensaios clínicos.

Vários estudos têm demonstrado uma forte correlação entre níveis séricos elevados de colesterol e o aumento da incidência de riscos de coronariopatias. Os resultados obtidos nos ensaios clínicos fase II demonstram que o grupo tratado com quitosana/lactose, inicialmente, apresentavam níveis de colesterol total de 325,3 mg/dl, estando, portanto, situados dentro dos valores considerados como de alto risco de incidência de coronariopatias (≥ 240 mg/dl). Entretanto, pode-se observar que após 30 e 60 dias de tratamento os níveis de colesterol total reduziram para 229,2 mg/dl e 205,8 mg/dl, respectivamente, passando a se enquadrarem dentro dos valores considerados como limítrofes (200-239 mg/dl).

Por outro lado, o grupo tratado com quitosana/*Aloe vera*, inicialmente, apresentavam níveis de colesterol total de 238,0 mg/dl, estando enquadrado dentro dos valores considerados como limítrofes (200-239 mg/dl) para coronariopatias, sendo que, após 30 dias de tratamento, os níveis de colesterol total reduziram para 182,4 mg/dl, estando, então, dentro dos níveis considerados ótimo (≤ 200 mg/dl).

Portanto, os resultados obtidos em humanos sugerem que o tratamentos com quitosana/lactose e quitosana/*Aloe vera* poderiam contribuir para a diminuição dos riscos de incidência de coronariopatias, uma vez que foram capazes de provocar a

redução significativa dos níveis séricos de colesterol total. Entretanto, o tratamento com quitosana/*Aloe vera* poderia ser considerado como o mais efetivo em termos de efeito hipocolesterolêmico, uma vez que foi capaz de reduzir, significativamente, os níveis de colesterol total para valores considerados dentro dos níveis considerados ótimo, quando comparados ao grupo placebo e na avaliação tempo-dependente.

Em relação aos níveis de HDL-colesterol, os resultados obtidos nos ensaios clínicos demonstram que não houve alteração significativa nos pacientes tratados com quitosana e associações, quando comparados aos grupo placebo, ou até mesmo, na avaliação tempo-dependente. Este perfil se mostrou diferente dos obtidos em ratos, onde foi observado que o tratamento com quitosana/lactose e quitosana/*Aloe vera* foi capaz de aumentar significativamente os níveis de HDL-colesterol. WUOLIJOKI e colaboradores (1999) também não observaram uma alteração significativa de HDL-colesterol em pacientes submetidos ao tratamento com quitosana, muito embora há relatos na literatura que demonstram um aumento dos níveis de HDL-colesterol em pacientes tratados com a mesma (MAEZAKI, 1993). Desta forma, os resultados obtidos nos ensaios clínicos sugerem que o tratamento com quitosana e associações, possivelmente, não exerceria efeito sobre os níveis de HDL-colesterol, embora foi observado, em 60 dias de tratamento, valores considerados baixos para humanos (< 40 mg/dl), o que poderia ser justificado pelo número reduzido de pacientes, com conseqüente comprometimento da análise estatística dos resultados obtidos no referido tempo de tratamento.

Quanto aos níveis de LDL-colesterol, os resultados obtidos nos ensaios clínicos fase II demonstram que o tratamento com quitosana/lactose foi capaz de provocar um decréscimo de 86,8 mg/dl (2,2 mmol/l) após 30 dias e de 89,5 mg/dl (2,3 mmol/l) após 60 dias de tratamento, o que corresponde a uma redução de 41,8% e 43,1%, respectivamente, dos níveis séricos de LDL-colesterol.

O tratamento com quitosana/*Aloe vera* também apresentou um efeito significativo, sendo capaz de provocar um decréscimo de 34,2 mg/dl (0,8 mmol/l) após 30 dias de tratamento, o que corresponde a uma redução de 24,1% dos níveis séricos de LDL-colesterol.

WUOLIJOKI e colaboradores (1999) também observaram o efeito redutor dos níveis de LDL-colesterol em pacientes tratados com quitosana, não sendo observado, entretanto, uma redução significativa nos níveis de colesterol.

O perfil obtido nos ensaios clínicos fase II se mostrou diferente dos resultados obtidos em ratos, cujo tratamento mais efetivo foi o da quitosana/*Brassica olearaceae*, sendo que redução dos níveis de colesterol foi obtida apenas em 35 dias de tratamento, não se estendendo em um maior prazo como foi observado com nos ensaios clínicos.

O aumento da incidência de riscos de cardiopatias tem sido correlacionado com níveis elevados de LDL-colesterol. Os resultados obtidos nos ensaios clínicos fase II demonstram que o grupo tratado com quitosana/lactose, inicialmente, apresentavam níveis de LDL-colesterol de 207,4 mg/dl, estando, portanto, situados dentro dos valores considerados como muito alto (≥ 190 mg/dl). Entretanto, pode-se observar que após 30 e 60 dias de tratamento os níveis de colesterol reduziram para 120,6 mg/dl e 117,9 mg/dl respectivamente, passando a se enquadrarem dentro dos valores considerados como desejáveis (100 - 129 mg/dl).

Por outro lado, o grupo tratado com quitosana/*Aloe vera*, inicialmente, apresentavam níveis de LDL-colesterol de 141,8 mg/dl, estando enquadrado dentro dos valores considerados como limítrofes (130 -159 mg/dl) para coronariopatias, sendo que, após 30 dias de tratamento, os níveis de LDL-colesterol reduziram para 107,6 mg/dl, estando, portanto, dentro dos níveis desejáveis (100 - 129 mg/dl).

Portanto, os resultados obtidos em humanos sugerem que o tratamentos com quitosana/lactose e quitosana/*Aloe vera* foram os mais efetivos na redução de LDL-colesterol, uma vez que foram capazes de reduzir significativamente os níveis de LDL-colesterol para valores considerados dentro dos níveis desejáveis, podendo, desta forma, contribuir para a diminuição dos riscos de incidência de coronariopatia.

Em relação aos níveis de VLDL-colesterol, os resultados obtidos nos ensaios clínicos fase II demonstram que não houve alteração significativa nos pacientes tratados com quitosana e associações, quando comparados aos grupo placebo ou na avaliação tempo-dependente. No entanto, os resultados observados em ratos se mostraram diferentes, onde se observou uma redução dos níveis de VLDL-colesterol nos grupos tratados com quitosana e associações em 35 dias de tratamento. A partir dos resultados obtidos pode-se sugerir que a quitosana e associações não exerceria efeitos sobre os níveis de VLDL-colesterol em humanos.

Em relação aos níveis de triglicerídeos, os resultados obtidos nos ensaios clínicos fase II demonstram que não houve alteração significativa nos pacientes tratados com quitosana e associações, quando comparados aos grupo placebo ou na

avaliação tempo-dependente. No entanto, os resultados observados em ratos se mostraram diferentes, onde se observou uma redução dos níveis de triglicerídeos nos grupos tratados com quitosana e associações em 35 dias de tratamento.

Os resultados se apresentaram diferentes dos obtidos por WUOLJOKI e colaboradores (1999), os quais observaram um acréscimo moderado de triglicerídeos em pacientes submetidos ao tratamento com quitosana. Semelhantes resultados foram observados por PITTLER e colaboradores (1999) que também constataram uma não alteração nos níveis de triglicerídeos em paciente submetidos ao tratamento com quitosana.

A partir dos resultados obtidos pode-se sugerir que a quitosana e associações não exerceria efeitos sobre os níveis de triglicerídeos em humanos, embora foi observado, em 60 dias de tratamento, valores considerados altos para humanos (200 - 499 mg/dl), o que poderia ser justificado pelo número reduzido de pacientes com conseqüente comprometimento da análise estatística dos resultados obtidos no referido tempo de tratamento.

Em resumo, os resultados obtidos nos ensaios clínicos fase II demonstram que o tratamento com quitosana/*Aloe vera* apresentou um efeito hipolipemiante mais efetivo, uma vez que foi capaz de reduzir significativamente os níveis de colesterol total para valores considerados ótimo, quando comparado ao grupo placebo e na avaliação tempo-dependente, sendo também capaz de reduzir os níveis de LDL-colesterol para valores considerados dentro dos níveis desejáveis. Pode-se constatar também que não houve alteração significativa na atividade da fosfatase alcalina, sugerindo que o tratamento não acarretariam em disfunção intestinal ou hepática. Além disso, o tratamento com quitosana/*Aloe vera* foi o que apresentou menores índices de efeitos indesejáveis, o que contribuiria para uma maior adesão do paciente ao tratamento.

Uma vez que a incidência de aterosclerose é maior em indivíduos que apresentam níveis plasmáticos elevados de colesterol e LDL-colesterol, pode-se sugerir que a associação quitosana/*Aloe vera* se mostra como uma alternativa terapêutica para quadros de hipercolesterolemia, o que contribuiria para a prevenção e/ou tratamento de processos aterogênicos, com menores riscos de efeitos indesejáveis.

Embora tenha sido observado o efeito hipolipemiante da quitosana e associações nos ensaios pré-clínicos e clínicos fase II, o mecanismo de ação sobre os parâmetros avaliados ainda não está bem elucidado.

Trabalhos têm demonstrado que a quitosana é capaz de provocar alteração na absorção e excreção de nutrientes sem, contudo, alterar os parâmetros nutricionais em animais de laboratório (SUGANO, 1988; SHIAU & YU, 1998). O efeito hipolipemiante da quitosana tem sido atribuído a sua capacidade de, na forma solúvel, se ligar aos lipídeos da dieta, particularmente ao colesterol, a nível estomacal, vindo a assumir a forma de gel a nível intestinal, formando micelas lipídicas rígidas, protegidas contra o ataque de enzimas pancreáticas e intestinais, sendo excretadas nas fezes o que provocaria a redução nos níveis plasmáticos de lipídeos (KANAUCHI, 1995). Para tanto, MUZZARELI (1997) propõe ser necessário que a quitosana apresente um certo grau de polimerização, bem como um grau de desacetilação moderado e alta viscosidade para que o polímero seja mais efetivo em sua ação.

Ensaio *in vitro* também têm demonstrado que a quitosana seria capaz de adsorver partículas de LDL-colesterol (YIHUA & BINGLIN, 1997).

A dose também seria um fator importante para o efeito hipocolesterolêmico da quitosana, onde tem-se observado que o suplemento de até 7% de quitosana à dieta, seria capaz de provocar a redução dos níveis plasmáticos de colesterol, sem haver a estimulação da HMG-CoA redutase e, desta forma, evitaria o mecanismo compensatório da biossíntese do colesterol (MUZZARELI, 1997).

A ação hipolipemiante observada na quitosana hidrossolúvel utilizada nos ensaios pré-clínicos em ratos e clínicos fase II em humanos poderia estar associada a sua alta solubilidade, como também a um grau de desacetilação moderado e uma massa molar considerada média, cujas características poderia contribuir para uma maior ligação aos lipídeos da dieta, com conseqüente diminuição da absorção intestinal e aumento da excreção fecal dos mesmos. Além disso, a atividade hipolipemiante mais efetiva observada no tratamento com a quitosana/*Aloe vera* poderia estar associada à presença de *Aloe vera*, uma vez que esta planta é capaz de aumentar o trânsito intestinal, contribuindo para uma maior excreção dos lipídeos da dieta, e que também, segundo REYNOLDS (1999), possuiria um efeito hipocolesterolêmico.

Apesar das proposições até então apresentadas, a elucidação do mecanismo de ação parece ser um dos grandes desafios para a avaliação do possível efeito hipolipemiante da quitosana.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos ensaios pré-clínicos em ratos e clínicos fase II em humanos nos permitem propor as seguintes conclusões:

. Os ensaios pré-clínicos demonstram que a quitosana hidrossolúvel e associações apresentam um efeito sobre os níveis lipêmicos em ratos, uma vez que foram capazes de provocar a redução significativa de colesterol total, triglicerídeos, LDL-colesterol e VLDL-colesterol, bem como, uma elevação significativa nos níveis de HDL-colesterol, sendo que o tratamento com quitosana/*Brassica olearaceae* foi o mais efetivo.

. O efeito da quitosana hidrossolúvel e associações sobre os níveis lipêmicos em ratos foi mais efetivo em 35 dias de tratamento, sendo que após um período mais prolongado, não são observadas alterações significativas, cuja compensação poderia ser justificada por estímulo da biossíntese e/ou uma maior mobilização de nutrientes de reserva;

. Os resultados pré-clínicos em ratos demonstram que o tratamento com quitosana hidrossolúvel e associações foram capazes de provocar efeitos sobre os parâmetros bioquímicos avaliados sem, contudo, alterar os parâmetros nutricionais;

. Os resultados dos ensaios clínicos fase II demonstram que houve uma maior adesão em pacientes tratados com quitosana hidrossolúvel/*Aloe vera*, o que poderia estar associado a propriedade laxativa da *Aloe vera*, com conseqüente diminuição de problemas gastrointestinais;

. O tratamento com quitosana hidrossolúvel/*Aloe vera* foi o mais efetivo sobre a lipemia, uma vez que foi capaz de reduzir os níveis de colesterol total, como também de LDL-colesterol, sem provocar alteração nos níveis de HDL-colesterol, VLDL-colesterol e triglicerídeos;

. Os resultados obtidos nos ensaios clínicos fase II sugerem, portanto, que a associação quitosana hidrossolúvel/*Aloe vera* se mostra como uma alternativa terapêutica para

quadros de hipercolesterolemia, contribuindo, desta forma, para a prevenção e/ou tratamento de processos aterogênicos.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nos ensaios pré-clínicos em ratos e clínicos fase II em humanos apontam para algumas perspectivas no sentido se promover modificações nos procedimentos efetuados ou, até mesmo, de se introduzir ensaios complementares.

Dentre estas modificações poderia-se sugerir o aumento da dose diária de quitosana hidrossolúvel e associações com vistas a conferir um maior potencial hipolipemiante, uma vez que já tem sido descrito na literatura a utilização de quitosana em dose de 3 a 6g/dia em humanos, sendo que nos ensaios clínicos fase II aqui desenvolvidos, foram utilizados apenas de 3 g/dia de quitosana hidrossolúvel e associações. Além do mais, tem-se descrito na literatura que a quitosana poderia ser utilizada até 7% da dieta sem provocar efeitos sobre enzimas chave do metabolismo do colesterol e até 10 % sem provocar toxicidade.

Dentre os ensaios complementares poderia-se repetir o tratamento com a associação quitosana/*Aloe vera*, aumentando a amostragem com vistas a avaliar o seu efeito hipolipemiante e a um período mais prolongado de tratamento, uma vez que esta associação se mostrou mais efetiva nos ensaios clínicos fase II.

Poderia-se sugerir, como ensaio complementar, a avaliação do potencial hipolipemiante em pacientes com níveis de colesterol total considerados alto (≥ 240 mg/dl), os quais estariam mais susceptíveis ao risco de incidência de coronariopatia.

Como ensaio complementar, também poderia-se sugerir o tratamento com uma nova formulação composta de quitosana/*Aloe vera*/*Brassica olearaceae*, no sentido de se avaliar o efeito sobre os níveis lipêmicos da associação proposta.

Poderia-se também avaliar o efeito dos diferentes tratamentos sobre os níveis séricos de LDL e VLDL, bem como, sobre a excreção de colesterol e seus metabólitos nas fezes.

Poderia-se também introduzir ensaios de avaliação do potencial antioxidante da quitosana e associações, bem como, ensaios de avaliação do efeito da quitosana solúvel e associações sobre o processo aterogênico, através de análise histológica, utilizando-se coelhos como modelo nos ensaios pré-clínicos.

Podia-se sugerir a execução de ensaios complementares que elucidasse melhor o mecanismo de ação da quitosana sobre os parâmetros bioquímicos avaliados, como por exemplo, a dosagem de colesterol e derivados nas fezes.

Outra perspectiva seria a possibilidade de se avaliar efeito antiobesidade da quitosana hidrossolúvel e associações nos ensaios clínicos, apesar de que, em animais de laboratório, este efeito não tenha sido comprovado.

Podia-se também provocar modificações na estrutura da quitosana, com vistas a aumentar o seu efeito hipolipemiante

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIANE, F. B. Herb-drug interactions. *The Lancet*, v. 355, p.134-138, 2000.
- ALEXANDER, J. K. Obesity and coronary heart disease. *Am. J. of The Med. Sci.*, v. 321, n. 4, p. 215-224, 2001.
- ANGELLON, L. B.; ENRIQUE, C. T. Intracellular transport of bile acids. *Bioch. et Biophys. Acta (BBA) - Mol. and Cell Bio. of Lipids*, v. 1486, n. 1, p. 198-209, 2000.
- AVIRAM, M. Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases. *Free Radical Research*. 33: S85-S97, Suppl. S, 2000.
- BABU, J. R.; SUNDRAVEL, S.; ARUMUGAM, G. *et al.* Salubrious effect of vitamin C and vitamin E on tamoxifen-treated women in breast cancer with reference to plasma lipid and lipoprotein levels. *Cancer Lett*, 151: (1) p. 1-5, 2000.
- BAYNES & DOMINICZAK. *Bioquímica Médica*. 2000.
- BRENDEL, C.; FRUCHART, J. C.; AUWERX, J. *et al.* Transcriptional regulation of cholesterol metabolism. *Med. Sci.*, v. 15, n. 1, p. 56-62, 1999.
- BROUSSIGNAC, P. Un haut polymère naturel peu connu dans l'industrie le chitosane. *Chim. Ind. Gén. Chim.*, v. 99, n. 9, p. 1241-1247, 1970.
- BROWN, B. G.; ZAMBON, A; POLIN, D. *et al.* Use of niacin, statins, and resins in patients with combined hyperlipidemia. *Am. J. Cardiol.* , v. 81, n. 4A, p. 52B-59b, 1998.
- BROWA, A. I. D. A concise review of the cost-effectiveness of coronay heart disease prevention. *Med. Clin. of North Am.*, v. 84 , n. 1, p. 279, 2000.

BRUNETON, J. *Pharmacognosy. Phytochemistry. Medicinal Plants*. Ed. Lavoisier, England, 915 p., 1995.

CARR, A. C.; ZHU, B. Z.; FREI, B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E).; *Circulation Research*, 87: (5), p. 349-354, 2000.

CHAMPE, P. C. & HARVEY, R. A. *Bioquímica Ilustrada*. 2^a ed. Porto Alegre: Artmed, 446 p., 2000.

CHIANG, M. T.; YAO, H. T.; CHEN, H. C. Effect of dietary chitosans with different viscosity on plasma lipids and lipid peroxidation in rats fed on a diet enriched with cholesterol *Biosci Biotech Bioch*, 64: (5), p. 965-971, 2000.

CHUN, S.; MIN, M. K.; PARK, H. *et al*. The risk groups for coronary heart disease in Koreans. Assessment by distribution of serum lipid concentrations. *Clin. Chem. and Lab. Med.*, v. 37, n. 10, p. 969-974, 1999.

CRAUSTON, D. *et al*. Dietary fiber and gastrointestinal disease. *Br. J. Surg.*, v. 75, n. 1, p. , 1988.

DAVID, S. L. Flavonoids and the oxidation of low-density lipoprotein. *Nutrition*, v. 17, p. 63-66, 2001.

DENNIS, E. V.; den BOSCH, H. V. Cholesterol in the year 2000. *Bio. et Biophys. Acta (BBA) - Mol. and Cell Biol. Lipids*, v. 1529, n. 1-3, p. 1-8, 2000.

DEUCHI, K.; KANAUCHI, O.; SHIZUKUISHI, M.; KOBAYASHI, E. Continuous and massive intake of chitosan affects mineral and fat-soluble vitamin status in rats fed on a high-fat diet. *Bioscience Biotechnology And Biochemistry*, 59: (7), p. 1211-1216, 1995.

DOUGLAS, J. O.; CONNOR, C. H.; THOMAS, E. M. Dietary chitosan inhibits hypercholesterolaemia and atherogenesis in the apolipoprotein E-deficient mouse model of atherosclerosis, *Atherosclerosis*, v. 138, p. 329-334, 1998.

DOWNS, J. R.; CLEARFIELD, M.; WEIS, S. *et al.* Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels – Results of AFCAPS/TexCAPS. *Jam. Med. Assoc.*, v. 279, n. 20, p. 1615-1622, 1998.

DUJOVNE, C. A. New lipid lowering drugs and new effects of old drugs. *Curr. Opin. Lipidol.*, v. 8, p. 362-368, 1997.

EINARSSON, K.; ERICSSON, S.; EWERTH, S. *et al.* Bile-acid sequestrants – mechanisms of action on bile-acid and cholesterol-metabolism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v. 40, n. 1, p. s53-s58, 1991.

ELLEGARD, L.; BOSAEUS, I.; ANDERSSON, H. W. Recommended changes in fat and fibre intake affect cholesterol absorption and sterol excretion? An ileostomy study. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v. 54, n. 1, p. 306-313, 2000.

EVANS, P.; HALLIWELL, B. Free radicals and hearing – cause, consequence, and criteria. *Ann NY Acad Sci.*, v. 884, n. 1, p. 19-40, 1999.

FAHEY, J. W.; STEPHENSON, K. K. Cancer chemoprotective effects of cruciferous vegetables. *Hortscience*, 34: (7), p. 1159-1163, 1999.

FRANCESCO, V.; LUISA, B.; CLAUDIO, G. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals, *Cardiovascular Research*, v. 47, p. 419-425, 2000.

FRIEDEWALD, W. T. *et al.* Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* v. 18, p. 499-502, 1972.

FUHRMAN, B.; ELIS, A.; AVIRAM, M. Hypocholesterolemic effect of lycopene and beta-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages.; *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 233: (3), p. 658-662, 1997.

FURRER, H. A new class of potent hypolipemic agents raising high-density lipoproteins – synthesis, reactions and pharmacological properties. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 29, n. 11, p. 819-829, 1994.

GALLAHER, C. M.; MUNION, J.; HESSLINK, R. JR.; WISE J.; GALLAHER, D. D. Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *Journal of Nutrition*, v. 130, p. 2753-2759, 2000.

GHANNEM, H.; DARIOLI, R.; LIMAN, K. *et al.* Epidemiology of cardiovascular risk factors among schoolchildren in Sousse, Tunisia. *Journal of Cardiovas. Risk*, v. 8, n. 2, p. 87-91, 2001.

GOTTO, A. M.; WHITNEY, E.; STEIN, E. A. *et al.* Relation between baseline and on-treatment lipid parameters and first acute major coronary events in the Air Force/Texas coronary atherosclerosis prevention study (AFCAPS/TexCAPS). *Circul.*, v. 101, n. 5, p. 477-484, 2000.

GREEVENBROEK, M. J. van; BRUIN, T. W. A. Chylomicron synthesis by intestinal cells *in vitro* and *in vivo*. *Atheroscler*, v. 141, suppl 1, p. 9-16, 1998.

HACKMAN, R. H. Studies on chitin. *Aust. J. Biol. Sci.*, p. 168-178, 1953.

HAN, L. K.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. *International Journal of Obesity*, 23: (2), p. 174-179, 1999.

HOLLMAN, P. C. H.; ARTS, I. C. W. Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 80: (7), p. 1081-1093, 2000.

HOPKINS, J. C. Statins: Effective antiatherosclerotic therapy. *Am. Heart J.*, v. 139, p. 577-583, 2000.

IKEDA, I. *et al.* Effects of chitosan hydrolysates on lipid absorption and on serum and liver chickens to chitosans of different viscosity. *Journal of Agricultural an Food Chemistry*, v. 41, 1993.

JAYACHANDRAN, M.; ARIVAZHAGAN, P.; PANNEERSELVAM, C. Age-associated plasma lipids, lipid peroxidation, and antioxidant systems in relation to vitamin C supplementation in humans. *Journal of Anti-Aging Medicine*, 3: (4), p. 437-445, 2000.

JENKINS, D. J. A.; KENDALL, C. W. C.; AXELSEN, M. *et al.* Viscous and nonviscous fibres, nonabsorbable and low glycaemic index carbohydrates, blood lipids and coronary heart disease. *Current Opinion in Lipidology*, v. 11, n. 1, p. 49-56, 2000.

JENNINGS, C. D.; BOLEYN, K.; BRIDGES, S. R. *et al.* A comparison of the lipid-lowering and intestinal morphological effects of cholestyramine chitosan, and oat gum in rats. *Proc. of The Soc. For Exper. Biol. And Med.*, v. 189, n. 1, p. 13-20, 1988.

JING, S-B.; LI, L.; JI, D.; TAKIGUCHI, Y.; YAMAGUCHI, T. Effect of chitosan on renal function in patients with chronic renal failure. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. v. 49, p.721-723, 1997.

JOYCE, J. R.; MANGELSDORF, D. J. Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism. *Curr. Opin. Biotech.*, v. 10 n. 6, p. 557-563, 1999.

KANAUCHIO, O. *et al.* Increasing effect of chitosan and ascorbic acid mixture on fecal dietary fat excretion. *Bios. Biotec. Biochem.*, 589: (9), p. 1617-1620, 1994.

KÁDÁR, A.; GLASZ, T. Development of atherosclerosis and plaque biology. *Cardiovascular Surgery*, v. 9, n. 2, p. 109-121, 2001.

KLEIN, B. P.; KURILICH, A. C. Processing effects on dietary antioxidants from plant foods *Hortscience*, 35: (4), p. 580-584, 2000.

KOIDE, S. S. Chitin-chitosan: Properties, benefits and risks. *Nutrition Research*, v. 18, p. 1091-1101, 1998.

KONG, S.X.D. *et al.* Efficacy of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors in the treatment of patients with hypercholesterolemia: a meta-analysis of clinical trials. *Clin Ther*, 19: (4), p. 778-79, 1997.

KRITCHEVSKY, D. J. J. *et al.* Dietary fiber and other dietary factors in hypercholesterolemia. *Clini. Nutr.* v.30, 1977.

LEE, K.Y.; WEINTRAUB, S.T.; YU, B. P. Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. *Free Radical Bio Med.*, 28: (2), p. 261-265, 2000.

LEESON, C. P. M.; WHINCUP, P. H.; COOK, D. G. *et al.* Cholesterol and arterial distensibility in the first decade of life: A population-based study. *Circ.*, v. 101, n. 1, p. 41533-1538, 2000.

LEHOUXI, J.G. *et al.* Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology*, 1993.

LEJA, M.; MARECZEK, A.; STARZYNSKA, A.; ROZEK, S. Antioxidant ability of broccoli flower buds during short-term storage. *Food Chemistry*, 72: (2), p. 219-222, 2001.

LUIS, B. A.; ENRIQUE, C. T. Intracellular transport of bile acids, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1486, p.198-209, 2000.

LISCUM, L.; MUNN, N. J. Intracellular cholesterol transport. *Bioch. et Biophys. Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1438, n. 1, p. 19-37, 1999.

MAEZAKI, Y.; TSUJI, K.; NAKAGAWA, Y.; KAWAI, Y.; AKIMOTO, M.; TSUGITA, T.; TAKEKAWA, W.; TERADA, A.; HARA, H.; MITSUOKA, T. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Bioscience Biotechnology And Biochemistry*, 57: (9), p. 1439-1444, 1993.

MAJETI, N. V.; RAVI, K. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, v. 46, p. 1-27, 2000.

MALLOY, M. J.; RAVIS, W. R.; PENNELL, A. T. *et al.* Effects of cholestyramine resin on single dose valproate pharmacokinetics. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 34, n. 5, p. 208-211, 1996.

MARZZOCO, A. & TORRES, B. B. *Bioquímica Básica*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1999.

MEYER, H. W.; RICHTER, W. Freeze-fracture studies on lipids and membranes. *Micron*, v. 32, n. 6, p. 615-644, 2001.

MIURA, T.; USAMI, M.; TSUURA, Y.; ISHIDA, H.; SEINO, Y. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of chitosan in normal and neonatal streptozotocin-induced diabetic mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 18: (11), p. 1623-1625, 1995.

MONTGOMERY, R.; CONWAI, T. W.; SPECTOR, A. A. *Bioquímica: uma abordagem dirigida por casos*. 6ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 332-346, 1996.

MUZZARELLI, R. A. A., Human enzymatic activities related to therapeutic administration of chitin derivatives. *Cellular and Molecular Life Sciences*. v. 53, p. 131-140, 1997.

NADA, S. A.; BASHANDY, S. A. E.; NEGM, S. A.; evaluation of hypoglycemic activity of a traditional herbal preparation in male diabetic rats. *Source Fitoterapia*, 68(3), p. 240-244, 1997.

NEVES, N. M. S. *Nutrição e Doença Cardiovascular*, 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 115 p., 1997.

NISHINO, M.; MALLOY, M. J.; RUSSELL, J. *et al.* Lack of association of lipoprotein (a) levels with coronary calcium deposits in asymptomatic postmenopausal women. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v. 35, n. 2, p. 314-320, 2000.

ODES, H. S.; MADAR, Z. A double-blind trial of a celandin, aloe-vera and psyllium laxative preparation in adult patients with constipation. *Digestion*, 49: (2), p. 65-71, 1991.

OOI, T. C.; OOI, D. S. *et al.* The atherogenic significance of an elevated plasma triglyceride level. *Crit. Rev. Cl. Lab. Sci.*, v. 35, n. 6, p. 489-516, 1998.

OUMEISH, Y. O. Traditional Arabic medicine in dermatology; *Clinics in Dermatology*, v. 17, p. 13-20, 1999.

PARDINI, H. *Manual de exames*. Instituto de Patologia clínica H. Pardini, 2001.

PARK, M. K.; PARK, J. H.; KIM, N.Y. *et al.* Analysis of 13 phenolic compounds in aloe species by high performance liquid chromatography. *Phytochem Analysis*, 9: (4), p. 186-191, 1998.

PHAN, C. T.; TSO, P. Intestinal lipid absorption and transport. *Front Biosci*, v. 6, p. D299-D319, 2001.

PIGNONE, M. P.; PHILLIPS, C. S.; ATKINS, D.; TEUTSCH, S. M.; MULROW, C. D., LOHR, K. N. Screening and treating adults for lipid disorders. *American Journal of Preventive Medicine*, 20:(3), p. 77-89, Suppl. S, 2001.

PITTILO, R. M. Cigarette smoking, endothelial injury and cardiovascular disease. *Intern. J. of Exp. Pathol.*, v. 81, n. 4, p. 219-230, 2000.

PITTLER, M. H.; ABBOT, N. C.; HARKNESS, E. F.; ERNST, E. Randomized, double-blind trial of chitosan for body weight reduction, *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 53, p. 379-381, 1999.

PLUMB, G.W.; PRICE, K. R.; RHODES, M.J.C.; WILLIAMSON, G. Antioxidant properties of the major polyphenolic compounds in broccoli. *Free Radical Research*, 27: (4), p. 429-435, 1997.

RAVEL, R. Aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 616 p., 1995.

RAZDAN, A. *et al.* Hypolipidaemic, gastrointestinal and related responses of broiler chickens to chitosans of different viscosity. *Brit J.Nutri.*, 76: (3), p. 387-39, 1996.

RAZDAN, A.; PETTERSSON, D.; PETTERSSON, J. Broiler chicken body weights, feed intakes, plasma lipid and small-intestinal bile acid concentrations in response to feeding of chitosan and pectin. *British Journal of Nutrition*, 78: (2), p. 283-291, 1997.

RAZDAN, A.; PETTERSSON, D. Effect of chitin and chitosan on nutrient digestibility and plasma-lipid concentrations in broiler-chickens *British Journal of Nutrition*, 72: (2), p. 277-288, 1994.

REAL, J. T.; CHAVES, F. J.; MARTINEZ-USO, I. *et al.* Importance of HDL-cholesterol levels and the total/HDL-cholesterol ratio as a risk factor for coronary heart disease in molecularly defined heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur. Heart J.*, v. 22, n. 6, p. 465-471, 2001.

ROS, E. Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atheroscl.*, v. 151, n. 2 p. 357-379, 2000.

ROOB, J. M.; RABOLD, T.; HAYN, M.; KHOSHSORUR, G.; RESCH, U.; HOLZER, H.; WINKLHOFER-ROOB, B. M. Ex vivo low-density lipoprotein oxidizability and in vivo lipid peroxidation in patients on *Capdkidney International*, 59: S128-S136, Suppl. 78, 2001.

ROSA, E. A. S.; RODRIGUES, A. S. Total and individual glucosinolate content in 11 broccoli cultivars grown in early and late seasons. *Hortscience*, 36: (1), p. 56-59, 2001.

SCHONHOF, I.; KRUMBEIN, A. Content of essential substances of different broccoli types. *Gartenbauwissenschaft*, 61: (6), p. 281-288, 1996.

SHIAU, S-Y.; YU, Y-P. Chitin but not chitosan supplementation enhances growth of grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of Nutrition*, v. 128, p. 908-912, 1998.

SIMÕES, C.M.O. *et al*, Farmacognosia. da planta ao medicamento, 2ed. editora da UFSC, Florianópolis, 822 p., 2000.

SINGH, R. P. ; DHANALAKSHMI, S.; RAO, A. R. Chemomodulatory action of Aloe vera on the profiles of enzymes associated with carcinogen metabolism and antioxidant status regulation in mice. *Phytomedicine*, 7: (3), p. 209-219, 2000.

SLATTERY, M. L. ; BENSON, J.; CURTIN, K. *et al*. Carotenoids and colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71: (2), p. 575-582, 2000.

SMELLIE, W.; LORIMER, A. R. Adverse effects of the lipid-lowering drugs. *Adv. Drug React. and Toxicol. Rev.*, v. 11, n. 2, p. 71-92, 1992.

SPIEKER, L. E.; NOLL, G. A.; MANFRED, H. *et al.* Efficacy and tolerability of fluvastatin and bezafibrate in patients with hyperlipidemia and persistently high triglyceride levels. *J. of Cardio. Pharmacol.*, v. 35, p. 361-365, 2000.

STANLEY, L.; ROBBINS, M. D. *Patologia Estrutural e Funcional*, 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1230 p., 1991.

STEINER, S.; GATLIN, C. L.; LENNON, J. J. *et al.* Cholesterol biosynthesis regulation and protein changes in rat liver following treatment with fluvastatin. *Toxicology Letters*, v. 120, n. 1-3, p. 369-377, 2001.

STRYER LUBERT. *Biochemistry*, 14^a ed. New York: W. H. Freeman and Company, p. 1064, 1995.

SUGANO, M. *et al.* Hypocholesterolemic effects of chitosan in cholesterol-fed rats *Nutri Rep. Inter.*, 18(5): 531-537, 1978.

SUGANO, M.; WATANABE, S.; KISHI, A.; IZUME A.; OHTAKARA, A. Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosities in rats. *Lipids*, v. 23, p.187-191, 1988.

SUGANO, M.; FUJIKAWA, T.; HIRATSUJI, Y.; NAKASHIMA, K.; FUKUDA, N.; HASEGAWA, Y. A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats *American Journal Of Clinical Nutrition*, 33: (4), p. 787-793, 1980.

SZKLO, M. *et al.* Trends in plasma cholesterol levels in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Preventive Medicine*. v. 30, p. 252-259, 2000.

SYVANNE, M.; PAJUNEN, P.; KAHRI, J. *et al.* Determinants of the severity and extent of coronary artery disease in patients with type-2 diabetes and in nondiabetic subjects. *Cor. Art. Dis.*, v. 12, n. 2, p. 99-106, 2001.

TANSEY, T. R.; SHECHTER, I. Structure and regulation of mammalian squalene synthase. *Bioch. et Biophys. Acta (BBA) – Mol. and Cell Biol. of Lip.*, v. 1529, n. 1-3, p. 49-62, 2000.

THOMAS, J. S. Management of hyperlipidemia in children. *Progr. in Ped. Cardiol.*, v. 12, n. 2, p. 205-213, 2001.

VAN POPPEL, G.; VERHOEVEN, D. T. H.; VERHAGEN, H.; GOLDBOEHM, R. A. Brassica vegetables and cancer prevention - Epidemiology and mechanisms. *Advances In Nutrition And Cancer*, 472: (2), p.159-168, 1999.

VAHOUNNY, G. Comparative effects of chitosan and cholestyramine lymphatic absorption of lipids in the rat. *The Am. J. Clin. Nutr.*, v. 38, n.1, p. 278-284, 1983.

VANG, O. *et al.* Effects of dietary broccoli on antioxidant enzymes. *Clin. Chem.*, 41: (12b), p. 1910-1911, Part 2 Suppl., 1995.

VILSON, J. A. *et al.* A citrus extract plus ascorbic acid decreases lipids, lipid peroxides, lipoprotein oxidative susceptibility, and atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: (4), p. 1453-1459, 1998.

WATTS, G. F.; DIMMITT, S. B. Fibrates, dyslipoproteinaemia and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.*, v. 10, n. 6, p. 561-574, 1999.

YASUHIKO, F. *et al.* Effect of chitosan feeding on intestinal bile acid metabolism in rats. *Lipids*, 26 : (5), 1983.

YIHUA, Y. U.; BINGLIN, H. E. A new low density lipoprotein (LDL) adsorbent Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization. *Biotechnology*, v. 25, p. 445-450, 1997.

YONGCHAIYUDHA, S. ; RUNGPITARANGSI, V.; BUNYAPRAPHATSARA, N. *et al.* Antidiabetic activity of Aloe vera L juice .1. Clinical trial in new cases of diabetes mellitus. *Phytomedicine*, 3: (3), p. 241-243, 1996.

YOCHUM, L.; KUSHI, L. H. ; MEYER, K.; FOLSOM, A. R.; Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology*, 149: (10), p. 943-949, 1999.

YUGARANI, T. *et al.* Effects of polyphenolic natural-products on the lipid profiles of rats fed high-fat diets. *Lipids*, 27: (3), p. 181-186, 1992.

9 ANEXOS

ANEXO 1. Critérios de inclusão/exclusão do protocolo clínico

Critérios de Inclusão

Pacientes de ambos os sexos, cooperativos, idade entre 18 a 60 anos, foram elegíveis para o estudo desde que preencham os seguintes critérios:

A: Critérios clínicos

- pacientes clinicamente estáveis por pelo menos 21 dias antes do início do trabalho
- pacientes dislipidêmicos de ambos os sexos, cooperativos, idade entre 18 a 60 anos

B: Critério biológico

- pacientes com colesterol e/ou triglicerídeos plasmáticos elevados (relação LDL-colesterol/HDL-colesterol > 5mg/dl e triglicerídeos > 200mg/dl)

Critérios de exclusão

A: Estados fisiológicos, condições médicas prévias e/ou concomitantes

- mulheres grávidas
- pacientes agudamente doente
- pacientes terminais
- pacientes diabéticos
- história de acidente vascular cerebral nos últimos 6 meses
- dados clínicos ou biológicos sugestivos de doença renal grave, intestinal, hepática ou hematológica ou disfunção além do que é esperado na insuficiência cardíaca
- doença pulmonar obstrutiva crônica (todas as formas)
- pacientes com conhecida ou suspeita de hipersensibilidade a algum componente da droga

B: Critérios de exclusão cardiovascular

- pressão sistólica mantida abaixo de 90mmHg e/ou sintomas de hipotensão arterial tais como síncope, tonteira, fraqueza.
- história de infarto agudo do miocárdio nos últimos 3 meses
- pacientes portadores de doenças orovalvares
- fatores associados causando insuficiência cardíaca : hipo ou hipertireoidismo (incluindo tirotoxicose), anemia, mixoma atrial, hipertensão de difícil controle.

-arritmias severas que podem causar instabilidade hemodinâmica:
taquiarritmias atriais (flutter/fibrilação/atrial rápida) ou ventriculares,
ritmo idioventricular, bloqueios de 2^o ou 3^o grau

C: Critérios de exclusão biológicos

- níveis de creatinina sanguínea > 2 mg/100ml
- potássio sérico > 5.5 mEq/L ou < 3.5 mEq/L
- hiponatremia ($\text{Na} \leq 130$ mEq/L)
- Anemia (hemoglobina < 9 g%)
- níveis de glicemia > 147 mg/dl em dois exames consecutivos

ANEXO 2 . Formulário de identificação dos pacientes

PROJETO QUITOSANA CARDIOLOGIA /HU-UFRJ

01- Nome

.....

.....

02- N° Prontuário

--	--	--	--	--	--	--	--

03- Data de Nascimento

--	--	--	--	--	--	--	--

04-Raça

(1) Negra

(2) Outra

05- Sexo

(1) Masculino

(2) Feminino

06-Naturalidade.....

07-Data-----

• CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

(1)-Sim

(2)-Não

08-Pacientes ambos os sexos, cooperativos, idade entre 18 a 60 ano

09-Pacientes clinicamente estáveis por pelo menos 21 dias antes do início do trabalho

10-Pacientes sem tratamento medicamentoso

11-Pacientes com colesterol e triglicerídeos plasmáticos elevados
(Relação LDL-colesterol/HDL-colesterol > 5mg/dl e triglicerídeos > 200mg/dl).

• CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

(1)-Sim

(2)-Não

- | | |
|--|--------------------------|
| 12- Gravidez | <input type="checkbox"/> |
| 13-Doença aguda | <input type="checkbox"/> |
| 14-Paciente terminal | <input type="checkbox"/> |
| 15-Paciente diabético | <input type="checkbox"/> |
| 16-História de acidente vascular cerebral nos últimos 6 meses | <input type="checkbox"/> |
| 17-Dados clínicos ou biológicos sugestivos de doença renal grave, intestinal, hepática ou hematológica ou disfunção além do que é esperado | <input type="checkbox"/> |
| 18-Doença pulmonar obstrutiva crônica (todas as formas) | <input type="checkbox"/> |
| 19-Pacientes com conhecida ou suspeita de hipersensibilidade a algum componente da droga | <input type="checkbox"/> |
| 20-Níveis de creatinina sanguínea >2mg/100ml | <input type="checkbox"/> |
| 21-Potássio sérico >5,5mEq/L ou < 3,5mEq/L | <input type="checkbox"/> |
| 22-Hiponatremia (Na ≤ 130mEq/L) | <input type="checkbox"/> |
| 23-Anemia (hemoglobina < 9g%) | <input type="checkbox"/> |
| 24-Níveis de glicemia > 126 mg/dl em dois exames consecutivos | <input type="checkbox"/> |
| 25-Fatores geograficos ou social que torna impraticavel a participação do paciente no estudo | <input type="checkbox"/> |

*TESTES LABORATÓRIAS NA ADMISSÃO Data -----

26-Creatinina

27-Hemoglobina

28-Hematócrito

29-Glicemia

30-Leucócitos

31-Transaminases (TGO e TGP)

32-LDH total

33-Colesterol Total

34-HDL-colesterol

35-LDL-colesterol

36-Triglicerideos

37-CPK

38-TAP (tempo ativado de protrombina)

***EVENTOS CLINICOS DESDE O INICIO DO TRABALHO**

(1)-Sim

(2)-Não

39-Morte

40-Sintomas gastrintestinais (nauseas,flatulências,obstipação,diarreia)

41-Cefaléia

42-Dores musculares

43-Pruridos

44-Erupção cutânea

45-Púrpura trombocitopênica

46-Icterícia

47-Distúrbios do sono

48-Diminuição do libido

*** HABITOS**

49-Diagnóstico de Tabagismo

1-Nunca Fumou

2-Fumante (1 ou mais maço/dia)

3-Ex-fumante (não fuma nos últimos 6 meses)

4-Eventualmente

50-Alcoolismo Crônico (presença de duas ou mais respostas positivas)

(1)-Sim

(2)-Não

ou

-Se alguma vez sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida

parar de beber

-Se as pessoas o aborrecem porque criticam o seu modo de beber

-Se se sente culpado pela maneira com que costuma beber

-Se costuma beber pela manhã para diminuir o nervosismo ou ressaca

51-Você pratica alguma atividade física durante seu tempo de lazer

(1)-Sim (2)-Não

a-Quantas horas na semana

b-Quantos meses por ano

52-Seu grau de atividade física no lazer é

(1)-principalmente sedentária (2)-exercício leve (sentado: leitura, TV)
(3)-exercício moderado (esforço mínimo: pescar, caminhada, pintura) (4)-
exercício extremo (batimentos cardíacos rápidos: correr, jogar futebol,
natação)

53-Seu grau de atividade física no trabalho é

(1) predominantemente caminha no mesmo nível (2) principalmente
caminha em níveis diferentes (3) atividade física pesada (4)
principalmente sedentário

* ALIMENTAÇÃO

54-Que tipo de óleo ou gordura você frequentemente usa na cozinha

(1)-óleo de oliva (2)-óleo de milho (3)-margarina (4)-manteiga (5)-outro
óleo vegetal (6)-óleo de soja

Para cada bebida, quantos copos você bebe por dia

55-Café

56-Chá Chinês

57-Chá preto

58-Outro tipo de Chá

59-Você adiciona leite ao café

(1)-nunca (2)-algumas vezes (3)-sempre (4)-não se aplica

60-Você é vegetariano

(1)-Sim

(2)-Não

Qual a frequência que você se alimenta de cada um das seguintes categoria

	Nunca	diário	semanal	mensal
61-Leite	a _____	b _____	c _____	
d _____				
62-Ovos	a _____	b _____	c _____	d _____
63-Carne	a _____	b _____	c _____	
d _____				
64-Peixe	a _____	b _____	c _____	
d _____				
65-Legumes	a _____	b _____	c _____	d _____
66-Verduras	a _____	b _____	c _____	d _____
67-Açúcar	a _____	b _____	c _____	
d _____				
68-Grãos	a _____	b _____	c _____	
d _____				
69-Derivados de Leite	a _____	b _____	c _____	d _____
70-Codimentos	a _____	b _____	c _____	d _____
71-Doces	a _____	b _____	c _____	
d _____				
72-Frutas	a _____	b _____	c _____	
d _____				
73-Pickleds	a _____	b _____	c _____	d _____
74-Alimentos rápidos	a _____	b _____	c _____	
d _____				

75-Você trabalha atualmente

(1)-desempregado (2)-aposentado (3)-afastado seguro saúde (4)-Sim

76-Qual categoria se enquadra o seu trabalho

(1)-profissional liberal (2)-trabalhador especializado (3)-trabalhador geral (4)-dona de casa (5)-trabalhador rural (6)-militar (7)-comércio (8)-autônomo (9)-clério

* ESCOLARIDADE

77-Que nível de escolaridade você chegou a completar?

- 1-Analfabeto|
- 2-Nunca foi a escola mas sabe ler e escrever
- 3-Primeiro grau incompleto
- 4-Primeiro grau completo
- 5-Segundo grau incompleto
- 6-Segundo grau completo
- 7-Terceiro grau (curso universitário) completo

*** MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS**

78-Peso|_|_| kg

79 -Altura.....|_|_|_| cm

80-Índice de massa corporal (peso/altura²)

(1)-Peso normal (2)-Sobrepeso (3)-Obeso

81-Pressão arterial sistólica	1a.....	_ _ _ mmHg
“ “ diastólica	1a.....	_ _ _ mmHg
“ “ sistólica	2a.....	_ _ _ mmHg
“ “ diastólica	2a.....	_ _ _ mmHg

*** EXAME FÍSICO**

82-Ritmo Cardíaco (ausculta durante 1 min)

(1)-regular (2)-extrasist < 10/min (3)-extrasist > 10/min
(4)-irregular (5)-presença de amplo desdobramento deB₂

83-Sopros regurgitante Mitral e/ou Tricúspideo

(1) Sim (2) Não

84-Cardiomegalia : Presença dos parametros 1+2 ou sómente 3 ou 4

(1) Sim (2) Não

1-Índice cardio-torácico $\geq 0,50$

2-Volume cardíaco no homem ≥ 550 e na mulher ≥ 500
ou

3-Índice do diâmetro diastólico final de VE $\geq 34\text{mm}$

4-Índice do diâmetro do atrio esquerdo $\geq 25\text{mm}$

*** AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA**

(1) Sim (2) Não

85-Normal

86-Compatível com ICC

***ALTERAÇÕES NO ECG DE REPOUSO CONVENCIONAL**

(1)-Sim (2)-Não

87-Normal

88-BAV 1º grau+Alt de ST-T

89-BRE

90-Área Eletricamente Inativa

91-BRD

92-HBAE

93-Distúrbio condução AV (2 e/ou 3 grau)

94-Bradycardia sinusal

95-Disfunção do Nódulo Sinusal

96-Extra-Sístoles Ventriculares

97-Extra Vent Polimórficas frequentes

98-Taqui Vent Mono Não-Sustentada

99-Fibrilação Atrial

100-Sobrecarga Ventricular esquerda

Comentário :

ANEXO 3. Consentimento livre e esclarecido

Paciente No ||||

Consentimento livre esclarecido

Quitosana para o tratamento de Hiperlipidemias: Estudo Clínico Terapêutico
Piloto Fase II

Instituição: _____

Investigador: _____

Telefone:() _____

1. INTRODUÇÃO

Neste momento você está tendo a opção de participar de um estudo com a Quitosana, uma fibra solúvel proveniente da casca do camarão com ação redutora de colesterol e triglicerídeos. Antes de você decidir participar deste estudo, é importante que você leia as informações a seguir, referente ao estudo para o qual você está sendo convidado a participar. O investigador do estudo discutirá com você as dúvidas que você tenha sobre este consentimento ou sobre o estudo.

2. PROPOSTA DO ESTUDO

Este estudo está sendo realizado com uma nova droga chamada quitosana, já aprovada pelo Ministério da Saúde no Brasil. A quitosana já foi patenteada no Japão como produto farmacêutico para o tratamento da hipercolesterolemia desde 1979 e nos EUA a fibra insolúvel da quitosana tem sido utilizada com sucesso para redução de colesterol, triglicerídeos e obesidade. Várias pessoas tem tomado quitosana em doses entre 1 a 2g diariamente por até 30 dias. Após o lançamento comercial da quitosana no Japão e EUA, têm sido relatado raros casos de reações alérgicas não graves, constipação, náuseas e flatulências. Os principais efeitos colaterais em algumas pessoas foram náuseas, enjôo, dor de cabeça de intensidade leve e suportável e de curta duração. Como com qualquer droga nova, existe a possibilidade de complicações e efeitos colaterais indesejáveis que ainda são desconhecidos e que podem ocorrer.

3. DURAÇÃO DO ESTUDO E NÚMERO DE INDIVÍDUOS

Você será um dos 100 indivíduos que irão participar deste estudo o qual está sendo realizado em 2 centros universitários no Brasil. A duração esperada deste estudo é de aproximadamente 60 dias.

Mulheres com possibilidade de engravidar podem participar deste estudo, assim como as que estão utilizando métodos anticoncepcionais adequados, inclusive métodos de barreira. Mulheres que estiverem amamentando e mulheres grávidas não devem participar do estudo. Você não poderá doar sangue durante o estudo e nem durante um mês após sua finalização

4. PROCEDIMENTO A SEREM SEGUIDOS

O período deste estudo clínico é de aproximadamente 60 dias e você será solicitado a comparecer a este hospital para realizar 3 visitas no total. Na primeira visita, você passará por um exame clínico que inclui um raio-X do torax e um eletrocardiograma. Você deverá fornecer uma amostra de sangue. Em seguida você receberá dois frascos com 120 capsulas de quitosana, os quais deverá tomar por 30 dias consecutivos 4 capsulas 2 vezes ao dia. É muito importante que você tome a medicação conforme as instruções do médico. Após 30 dias aproximadamente, você retornará para a Segunda visita do estudo e novamente será examinado pelo médico do estudo. Nesta visita você fornecerá a Segunda amostra de sangue e receberá mais 120 capsulas de quitosana. A ultima visita será realizada após 60 dias do inicio do tratamento. Será coletado a ultima amostra de sangue. Caso ocorra alguma alteração em seus exames anteriores, o médico do estudo pode solicitar uma repetição destes exames nesta visita. Para sua própria segurança, não tome nenhum medicamento (mesmos aqueles vendidos sem receita médica) que não tenha sido prescrito ou aprovado pelo médico responsável por este estudo. Você terá toda liberdade de vir ao ambulatório para resolver qualquer dúvida junto ao seu médico assistente. É importante também que você informe ao seu médico qualquer mudança ou problema que ocorra durante este estudo, incluindo qualquer sintoma desagradável ou diferente que se manifeste, bem como a melhora que for observada.

5. RISCOS E DESCONFORTOS

Efeitos colaterais que podem ocorrer durante este estudo, baseado em estudo com animais e em experiências de outras pessoas que receberam quitosana, são os seguintes: dor de cabeça de leve intensidade com pequena duração, náuseas, vômitos e tonturas. Problemas e efeitos colaterais que não são conhecidos até o momento podem ocorrer. Você será avisado sobre quaisquer alterações na forma em que o estudo será conduzido e sobre quaisquer riscos identificados recentemente, aos quais você poderá estar exposto. A coleta de sangue implica em uma dor leve durante a picada e eventualmente no surgimento de um pequeno hematoma no local, em raros casos, uma infecção no local da coleta poderá ocorrer. Em pessoas mais sensíveis, a coleta por si só pode causar desmaios.

6. EXCLUSÃO DO ESTUDO

Existem neste estudo critérios de inclusão e exclusão que serão discutidos pelo investigador com você. Você estará excluído deste estudo caso não os

preencha. O investigador deste estudo pode, a qualquer momento, retirar você do mesmo, sem seu consentimento, pelas seguintes razões:

Se você voluntariamente desobedecer as orientações do estudo, como faltar constantemente às consultas ou faltar constantemente ao exames

No caso de efeitos colaterais graves, excepcionais ou raros ocorrendo com você ou com a grande maioria dos pacientes neste estudo ou em outros estudos sendo realizados em outras partes do mundo

Você pode optar por não fazer parte deste estudo ou descontinuar a sua participação no mesmo a qualquer momento, sem que isto acarrete em prejuízos para seu tratamento atual ou futuro.

7. POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DESTA ESTUDO

Você poderá responder favoravelmente ao tratamento com quitosana. O custo de todos os testes, exames e cuidados médicos necessários, como parte deste estudo, serão cobertos, sem nenhum custo para você. Outros pacientes podem vir a se beneficiar dos resultados deste estudo.

É possível, entretanto, que nenhum benefício à sua saúde ocorra durante ou após o estudo ser completado.

8. CONFIDENCIALIDADE

-As informações de seu histórico médico são confidenciais e serão tomadas todas as precauções para preservá-las. A menos que requerido judicialmente, apenas o investigador, auditores terão acesso a dados confidenciais de seu prontuário médico e dados que o identifiquem pelo nome.

-Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas médicas, apresentados em congressos ou eventos científicos ou às autoridades sanitárias, sem que seu nome seja mencionado em parte alguma.

-Assinando este consentimento você estará autorizando para estas pessoas o acesso ao seu prontuário médico e aos seus dados

-Todo o material biológico coletado será utilizado apenas neste estudo para realização dos exames laboratoriais específicos no próprio protocolo. Este material não será utilizado em outros estudos ou para outros fins.

9. NOVOS ACHADOS

Durante o estudo você será informado de qualquer nova descoberta significativa sobre os resultados de exames, que possa alterar sua vontade de continuar participante deste estudo

10. RESPOSTAS ÀS PERGUNTAS SOBRE ESTE ESTUDO

Se durante o estudo clínico você tiver problemas ou gostaria de esclarecer alguma dúvida sobre a conduta deste estudo, entre em contato com o:

Dr. _____-pelo

telefone: _____

11. PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar bem como desistir do mesmo a qualquer momento, antes ou durante o período do estudo sem qualquer prejuízo ao seu tratamento. Caso você decida descontinuar do estudo após seu início, para sua própria segurança você deverá retornar ao hospital para conversar com o médico do estudo para que ele possa orientá-lo sobre as possíveis opções.

CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR DESTE ESTUDO

Eu recebi uma cópia deste acordo de consentimento livre e esclarecido, li e compreendi este documento, na qual foram-me informados todos os dados importantes sobre a conduta deste estudo. Foi-me oferecida ampla oportunidade de fazer perguntas e recebi respostas que me satisfizeram totalmente. Se eu não participar ou se eu decidir suspender minha participação neste estudo, não serei penalizado e não renunciarei de quaisquer direitos legais. Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Assinatura do paciente

Assinatura do investigador

Data: __/__/__

Data: __/__/__

ANEXO 4. Resultados da análise microbiológica da quitosana hidrossolúvel e associações.

INDÚSTRIA FARMACÊUTICA SANTA TEREZINHA LTDA.

BOLETIM DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

PRODUTO: lactose

Nº LOTE: 500E Nº AMOSTRA: 5139 DATA: 28/05/01 COLETADOR: Celmo

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA			
MEIOS SELETIVOS		MEIOS DE IDENTIFICAÇÃO	
CALDO LACTOSADO	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	CETRIMIDE (pseudomas aeroginosa)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
SELENITO E CISTINA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	S. S (salmonela e shiguella, eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
CALDO DE SOJA TRIPTICASEÍNA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	EMB LEVINE (eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR SABOURAUD (fungos e leveduras)	<u>< 10 UFC</u>	MANITOL (estaphylococcus patog e ñ patogênicos)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR DE SOJA TRPTICASEÍNA	<u>< 10 UFC</u>	ÁGAR MAC CONKEY (grans neg.)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)

Resultado: () Aprovado
() Reprovado

Data: 01/06/01

[Signature]
Analista

[Signature]
Responsável Técnico

[Signature]
Gerente do Dep. Contr. Qual.

BOLETIM DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

PRODUTO: Clavixato de clindamicina + lactose

Nº LOTE: 501F Nº AMOSTRA: 5140 DATA: 28/05/01 COLETADOR: Celmo

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA			
MEIOS SELETIVOS		MEIOS DE IDENTIFICAÇÃO	
CALDO LACTOSADO	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	CETRIMIDE (pseudomas aeroginosa)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
SELENITO E CISTINA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	S. S (salmonela e shiguella, eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
CALDO DE SOJA TRIPTICASEÍNA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	EMB LEVINE (eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR SABOURAUD (fungos e leveduras)	<u>< 10 UFC</u>	MANITOL (estaphylococcus patog e ñ patogênicos)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR DE SOJA TRPTICASEÍNA	<u>< 10 UFC</u>	ÁGAR MAC CONKEY (grans neg.)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)

Resultado: () Aprovado
() Reprovado

Data: 01/06/01

[Signature]
Analista

[Signature]
Responsável Técnico

[Signature]
Gerente do Dep. Contr. Qual.

INDÚSTRIA FARMACÉUTICA SANTA TEREZINHA LTDA.

BOLETIM DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

PRODUTO: claudrato de Quilosoma + Aloe VeraNº LOTE: 502 F Nº AMOSTRA: 5141 DATA: 28/05/01 COLETADOR: Guarip

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA			
MEIOS SELETIVOS		MEIOS DE IDENTIFICAÇÃO	
CALDO LACTOSADO	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	CETRIMIDE (pseudomas aeruginosa)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
SELENITO E CISTINA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	S. S (salmonela e shiguelia, eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
CALDO DE SOJA TRIPTCASEÍNA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	EMB LEVINE (eschericchia coli)	POSITIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>) NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR SABOURAUD (fungos e leveduras)	<10 UFC	MANITOL (estaphylococcus patog e ã patogênicos)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR DE SOJA TRPTICASEÍNA	<10 UFC	ÁGAR MAC CONKEY (grans neg.)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)

Resultado: () Aprovado
() ReprovadoData: 01/06/01

Analista

Gerente do Dep. Contr. Qual.

Responsável Técnico

BOLETIM DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

PRODUTO: claudrato de Quilosoma + BrócolisNº LOTE: 503 F Nº AMOSTRA: 5142 DATA: 28/05/01 COLETADOR: Guarip

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA			
MEIOS SELETIVOS		MEIOS DE IDENTIFICAÇÃO	
CALDO LACTOSADO	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	CETRIMIDE (pseudomas aeruginosa)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
SELENITO E CISTINA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	S. S (salmonela e shiguelia, eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
CALDO DE SOJA TRIPTCASEÍNA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	EMB LEVINE (eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR SABOURAUD (fungos e leveduras)	<10 UFC	MANITOL (estaphylococcus patog e ã patogênicos)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR DE SOJA TRPTICASEÍNA	<10 UFC	ÁGAR MAC CONKEY (grans neg.)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)

Resultado: () Aprovado
() ReprovadoData: 01/06/01

Analista

Gerente do Dep. Contr. Qual.

Responsável Técnico

INDÚSTRIA FARMACÉUTICA SANTA TEREZINHA LTDA.

BOLETIM DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

PRODUTO: cloridrato de Clotrimazol + Aloe VeraNº LOTE: 502F Nº AMOSTRA: 5141 DATA: 28/06/01 COLETADOR: Guarip

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA			
MEIOS SELETIVOS		MEIOS DE IDENTIFICAÇÃO	
CALDO LACTOSADO	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	CETRIMIDE (pseudomas aeruginosa)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
SELENITO E CISTINA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	S. S (salmonela e shiguella, eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
CALDO DE SOJA TRIPTICASEÍNA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	EMB LEVINE (eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR SABOURAUD (fungos e leveduras)	<10 UFC	MANITOL (estaphylococcus patog e ñ patogênicos)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR DE SOJA TRIPTICASEÍNA	<10 UFC	ÁGAR MAC CONKEY (grans neg.)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)

Resultado: (X) Aprovado
() ReprovadoData: 01/06/01

Analista

Gerente do Dep. Contr. Qual.

Responsável Técnico

BOLETIM DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

PRODUTO: cloridrato de Clotrimazol + BrócolisNº LOTE: 503F Nº AMOSTRA: 5142 DATA: 28/06/01 COLETADOR: Guarip

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA			
MEIOS SELETIVOS		MEIOS DE IDENTIFICAÇÃO	
CALDO LACTOSADO	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	CETRIMIDE (pseudomas aeruginosa)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
SELENITO E CISTINA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	S. S (salmonela e shiguella, eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
CALDO DE SOJA TRIPTICASEÍNA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	EMB LEVINE (eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR SABOURAUD (fungos e leveduras)	<10 UFC	MANITOL (estaphylococcus patog e ñ patogênicos)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR DE SOJA TRIPTICASEÍNA	<10 UFC	ÁGAR MAC CONKEY (grans neg.)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)

Resultado: (X) Aprovado
() ReprovadoData: 01/06/01

Analista

Gerente do Dep. Contr. Qual.

Responsável Técnico

INDÚSTRIA FARMACÊUTICA SANTA TEREZINHA LTDA.

BOLETIM DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

PRODUTO: lactoseNº LOTE: 501F Nº AMOSTRA: 5468 DATA: 06/07/01 COLETADOR: Cláudio P.

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA			
MEIOS SELETIVOS		MEIOS DE IDENTIFICAÇÃO	
CALDO LACTOSADO	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	CETRIMIDE (pseudomas aeruginosa)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
SELENITO E CISTINA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	S. S (salmonela e shiguella, eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
CALDO DE SOJA TRIPTCASEÍNA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	EMB LEVINE (eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR SABOURAUD (fungos e leveduras)	< 10UFC	MANITOL (staphylococcus patog e ñ patogênicos)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR DE SOJA TRPTICASEÍNA	< 10UFC	ÁGAR MAC CONKEY (grans neg.)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)

Resultado: () Aprovado
() ReprovadoData: 10/07/01

Analista

Gerente do Dep. Contr. Qual.

Responsável Técnico

BOLETIM DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

PRODUTO: Urofona + BiotalesNº LOTE: 505F Nº AMOSTRA: 5469 DATA: 06/07/01 COLETADOR: Cláudio P.

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA			
MEIOS SELETIVOS		MEIOS DE IDENTIFICAÇÃO	
CALDO LACTOSADO	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	CETRIMIDE (pseudomas aeruginosa)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
SELENITO E CISTINA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	S. S (salmonela e shiguella, eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
CALDO DE SOJA TRIPTCASEÍNA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	EMB LEVINE (eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR SABOURAUD (fungos e leveduras)	< 10UFC	MANITOL (staphylococcus patog e ñ patogênicos)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR DE SOJA TRPTICASEÍNA	< 10UFC	ÁGAR MAC CONKEY (grans neg.)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)

Resultado: () Aprovado
() ReprovadoData: 10/07/01

Analista

Gerente do Dep. Contr. Qual.

Responsável Técnico

INDÚSTRIA FARMACÊUTICA SANTA TEREZINHA LTDA.

BOLETIM DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

PRODUTO: Cloridrato de Clindamicina + lactoseNº LOTE: 506F Nº AMOSTRA: 5470 DATA: 06/10/01 COLETADOR: Colina

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA			
MEIOS SELETIVOS		MEIOS DE IDENTIFICAÇÃO	
CALDO LACTOSADO	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	CETRIMIDE (pseudomas aeroginosa)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
SELENITO E CISTINA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	S. S (salmonela e shiguella, eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
CALDO DE SOJA TRIPTICASEÍNA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	EMB LEVINE (eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR SABOURAUD (fungos e leveduras)	< 10UFC	MANITOL (staphylococcus patog e ñ patogênicos)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR DE SOJA TRPTICASEÍNA	< 10UFC	ÁGAR MAC CONKEY (grans neg.)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)

Resultado: () Aprovado
() ReprovadoData: 10/07/01

Analista

Gerente do Dep. Contr. Qual.

Responsável Técnico

BOLETIM DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

PRODUTO: Cloridrato de Clindamicina + Alcool VelaNº LOTE: 507F Nº AMOSTRA: 5471 DATA: 06/07/01 COLETADOR: Colina

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA			
MEIOS SELETIVOS		MEIOS DE IDENTIFICAÇÃO	
CALDO LACTOSADO	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	CETRIMIDE (pseudomas aeroginosa)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
SELENITO E CISTINA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	S. S (salmonela e shiguella, eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
CALDO DE SOJA TRIPTICASEÍNA	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)	EMB LEVINE (eschericchia coli)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR SABOURAUD (fungos e leveduras)	< 10UFC	MANITOL (staphylococcus patog e ñ patogênicos)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)
ÁGAR DE SOJA TRPTICASEÍNA	< 10UFC	ÁGAR MAC CONKEY (grans neg.)	POSITIVO: () NEGATIVO: (<input checked="" type="checkbox"/>)

Resultado: () Aprovado
() ReprovadoData: 10/07/01

Analista

Gerente do Dep. Contr. Qual.

Responsável Técnico