

BR9432244

INIS-BR-3406

CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS DO ¹³¹I-STEVIOSÍDEO E SEUS METABÓLITOS

VALBERT NASCIMENTO CARDOSO

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau
de "Doutor em Ciências" na Área
de Tecnologia Nuclear.

Orientadora: Dra. Profa. Ma. Aparecida T.M. de Almeida

São Paulo

1993

ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS DO ^{131}I -STEVIOSÍDEO E SEUS METABÓLITOS

Valbert Nascimento Cardoso



Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de "Doutor em Ciências" na Área de Tecnologia Nuclear.

Orientadora: Dra. Profa. Ma. Aparecida T.M. de Almeida

1993

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP - IPEN

Aos meus Pais,

Júlio e Maria (in memoriam)

**A Cidinha, minha esposa,
e aos meus filhos:
Marco Túlio, Larissa e Gustavo**

AGRADECIMENTOS

A DEUS.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, na pessoa de seu Superintendente, Dr. Spero Penha Morato.

A Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade que me foi concedida para a execução deste trabalho.

A Faculdade de Farmácia da UFMG, Unidade à qual pertenço, pela liberação de minhas atividades acadêmicas durante a realização do Doutorado.

A Doutora Maria Aparecida T. M. de Almeida, pela orientação e apoio recebidos durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Mauro Alvarez da Universidade Estadual de Maringá, por ter gentilmente fornecido o steviosídeo e o steviol.

A Dra. Vânia Borghi, por ter sido a pessoa que me encaminhou ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

A CAPES/PICD pela concessão da bolsa de estudos.

Aos colegas da disciplina de Radioquímica, Silea Magno Machado, Moema G. Alvarenga, Elias Mansur Neto e Geraldo Hélio Coelho, pela compreensão e amizade.

Aos Professores Jorge Luiz Pesquero, Tasso Moares e Santos, Ricardo José Alves, pelos sábios conselhos e disposição sempre dispensada.

Ao Dr. Carlos Henrique Mesquita, pelo inestimável apoio durante a elaboração do modelo cinético.

Aos Pesquisadores Marycel F. Barbosa, Emiko Muramoto, Maria Tereza Colturato, João Osso Júnior, Rosana Herrerias e ao Técnico Alfredo dos Santos, pela valiosa colaboração na execução da parte experimental desta tese.

Aos colegas Elaine Bortoleti e Marcos Moisés, pelo apoio e amizade.

Um agradecimento muito especial à minha irmã Maria Cristina e ao meu cunhado Edson Hirasaky, por ter me acolhido em sua residência durante a minha permanência em São Paulo.

A Vanda Rangel, pela inestimável contribuição durante a digitação desta tese.

E a todos os demais que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMARIO

	Lista de Figuras	1
	Lista de Tabelas	2
	Resumo	4
	Abstract	7
I	INTRODUÇÃO	9
	1 Conceitos Gerais	10
	2 Stevia Rebaudiana Bertoni	11
	3 Características do Steviosídeo para Uso em Processamento de Alimentos	16
	4 Propriedades Biológicas e Tóxicas da Stevia Rebaudiana	17
	5 Estudos Farmacocinéticos com uso de Traçadores Radioativos	25
II	OBJETIVOS	27
III	MATERIAL E MÉTODOS	29
	1 Material	30
	2 Métodos	32

IV RESULTADOS	42
1 Determinação da Pureza do Steviosídeo e do Steviol	43
2 Espectro Infravermelho do ¹²⁷ I-steviosídeo	45
3 Otimização das Condições de Marcação do Steviosídeo com ¹³¹ I	45
4 Estabilidade do Steviosídeo Marcado com Iodo-131	49
5 Estudo da Distribuição Biológica do ¹³¹ I-steviosídeo	50
6 Identificação de Metabólitos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	58
7 Modelo Cinético	61
V DISCUSSÃO	67
VI CONCLUSÕES	77
VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Perfil de eluição em HPLC de steviol (A) e steviosídeo (B).....44
- Figura 2** - Espectros infravermelho do steviosídeo não iodado (A) e do steviosídeo iodado (B).....46
- Figura 3** - Percentagem da dose injetada de radioatividade eliminada na bile.....55
- Figura 4** - Percentagem da dose injetada de ^{131}I -steviosídeo presente no intestino delgado.....56
- Figura 5** - Perfil obtido em cromatografia líquida de alta eficiência de amostras de bile e urina.....60
- Figura 6** - Modelo cinético proposto para a distribuição do ^{131}I -steviosídeo.....61
- Figura 7** - Curvas simulada e experimental do decaimento plasmático do ^{131}I -steviosídeo.....64
- Figura 8** - Curvas simulada e experimental para corpo inteiro.....65

LISTA DE TABELAS

Tabela I	-	Influência da massa do steviosídeo sobre a marcação.....	47
Tabela II	-	Influência do tempo de reação sobre a marcação.....	47
Tabela III	-	Influência do volume de H ₂ O ₂ utilizado sobre a marcação.....	48
Tabela IV	-	Influência do pH da reação sobre a marcação.....	48
Tabela V	-	Níveis plasmáticos de radioatividade em diversos tempos após a administração de ¹³¹ I-steviosídeo.....	52
Tabela VI	-	Níveis de radioatividade presentes nos tecidos após a injeção de ¹³¹ I-steviosídeo.....	53
Tabela VII	-	Porcentagem da dose administrada presente na urina e fezes após a injeção i.v. de ¹³¹ I-steviosídeo.....	57
Tabela VIII	-	Porcentagem da dose administrada presente no corpo inteiro após injeção de ¹³¹ I-steviosídeo.....	59
Tabela IX	-	Excreções urinária e fecal, valores simulado e experimental.....	66

RESUMO

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP - IPEN

RESUMO

A *Stevia rebaudiana* é uma planta nativa do Paraguai e Brasil. Esta planta contém em suas folhas grandes quantidades de steviosídeo. Este glicosídeo é 300 vezes mais doce do que a sacarose e tem sido empregado como adoçante não calórico no Brasil, Japão e outros países. O steviosídeo é composto de steviol e três moléculas de glicose. estudos "in vitro" demonstraram que a microflora intestinal de rato degrada o steviosídeo a steviol. A toxicidade do steviosídeo tem sido extensivamente investigada, os resultados destas investigações sugerem que o steviosídeo apresenta baixa toxicidade para os mamíferos. Embora o steviosídeo não apresente atividade mutagênica, o steviol é mutagênico para *Salmonella typhimurium*. Como o uso do steviosídeo continua aumentando, o objetivo deste trabalho foi investigar a distribuição biológica e a ocorrência de uma possível degradação "in vivo" deste glicosídeo para steviol. Assim, 1,10 MBq de ^{131}I -steviosídeo foi injetado por via endovenosa em ratos machos Wistar. Os mais altos níveis de radioatividade foram observados no fígado e no intestino delgado, 10 e 120 minutos após a administração, respectivamente. A radioatividade eliminada na bile 2 horas após a injeção foi de 52% da dose originalmente injetada. A radioatividade excretada nas fezes e urina, 24 horas após a administração do ^{131}I -steviosídeo foi de 35,3% e 34,7%,

respectivamente, enquanto que 28.5% da dose original permanecia no corpo do animal.

Os resultados de HPLC da bile demonstraram que o steviol apareceu como principal metabólito, representando 47,3% da radioatividade, enquanto que o steviosídeo representou 37,3% e os 15,4% remanescentes foram devidos a um metabólito não identificado. Os resultados mostram que o steviosídeo foi parcialmente degradado "in vivo" para steviol e outro metabólito, e que parte da radioatividade foi absorvida pelo intestino delgado do rato.

O modelo de compartimentalização proposto e os valores obtidos com a simulação deste modelo ajustaram-se perfeitamente com os dados observados experimentalmente.

ABSTRACT

ABSTRACT

Stevia rebaudiana is a shrub widely found in Paraguay and Brazil, belonging to the compositae family. The leaves of this plant contain large amounts of stevioside, a sweetener 300 times as sweet as sucrose. The stevioside is composed of steviol, a diterpenic carboxylic alcohol, and three glucose molecules. It has been employed as a non-caloric sweetener in Brazil, Japan and other countries. The toxicity of stevioside has been extensively investigated, the results of these investigations suggest that stevioside presents low toxicity in mammals. "In vitro" studies have shown that rat intestinal microflora degrades stevioside to steviol. Although stevioside demonstrates no mutagenic activity, steviol is mutagenic for *Salmonella typhimurium*.

Since the use of stevioside as sugar substitute continues to increase, the purpose of this study is to investigate the biological distribution, excretion and the possibility of stevioside to be degraded to steviol "in vivo".

¹³¹I-stevioside (1,10MBq) was i.v. injected in Wistar male rats. its distribution in the body and metabolism were studied. The radioactivity level in the plasma was respectively 51.14% after 1 minute of the injection and after 60 minutes 5,60% of the original dose. The highest concentration of radioactivity was observed in the liver and the small intestine after 10 and

120 minutes. respectively. Radioactivity eliminated in the bile. 2 hours after injection was 52.0% of the original dose. At 24 hours. the radioactivity excreted into the feces and urine were 35.30% and 34.70% respectively, and the radioactivity remaining in the body was about 28.50% of the original dose.

RP-HPLC analysis of the bile showed that steviol appeared as a major metabolite, representing 47.3% of the radioactivity. while stevioside represented 37.3% and the remaining 15.4% was due to an unidentified metabolite. In the urine. however, RP-HPLC analysis did not show the presence of steviol. The results showed that stevioside was partially degraded "in vivo" to steviol and other metabolite, and that part of the radioactivity was absorbed from the small intestine.

The kinetic model proposed and the values obtained with the simulation of this model are in agreement with the experimental results.

I INTRODUÇÃO

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP - IPEN

1 CONCEITOS GERAIS

A preferência pelo sabor doce em uma certa faixa de intensidade é característica da espécie humana. Na décima-sexta semana de gestação, os fetos já apresentam desenvolvidas as regiões responsáveis pela identificação do sabor doce, propiciando aos recém-nascidos a capacidade de responderem favoravelmente às soluções adocicadas ^{13,44}.

No início deste século, o consumo de açúcar nos Estados Unidos foi estimado em 30% da dieta total de carboidratos, sendo que em 1980 este índice atingiu a 54%. O aumento no uso deste adoçante passou a receber atenção especial, já que, efeitos adversos foram observados em alguns segmentos da população ⁵⁰.

Sabe-se que a ingestão excessiva do açúcar propicia um aumento na ingestão de calorias, proporcionando ganho de peso e o aparecimento de doenças associadas com a obesidade. A obesidade é um fator de risco para doenças do coração, câncer, diabetes e outras patologias⁸. Neste sentido, as indústrias de alimentos têm procurado desenvolver adoçantes alternativos para substituir a sacarose, tendo como objetivo principal a redução na ingestão de calorias.

Dentre os compostos que apresentam sabor doce, as substâncias de origem natural têm sido objeto de constantes investigações nos recentes estudos sobre os adoçantes. As

pesquisas sobre os produtos de origem natural que eventualmente possam vir a substituir a sacarose, têm contribuído na descoberta de várias substâncias que possuem sabor intensamente doce. Assim, constatou-se intenso sabor doce em 150 plantas estudadas. Este sabor é proporcionado pela grande quantidade de açúcares que estas plantas possuem, ou pela presença de outros constituintes de sabor doce.

Embora estes adoçantes possam apresentar valor calórico similar aos carboidratos, a contribuição destas substâncias na ingestão de calorias é desprezível, uma vez que a quantidade usada é mínima devido ao alto poder adoçante. Dentre estas substâncias, encontra-se o steviosídeo, princípio doce presente nas folhas da *Stevia rebaudiana* Bertoni⁴³.

2 STEVIA REBAUDIANA BERTONI

A *Stevia rebaudiana* é uma planta originária do Paraguai pertencente a família Compositae, podendo ser encontrada também em áreas limítrofes com o Brasil, como por exemplo na região de Ponta Porã, no estado do Mato Grosso.

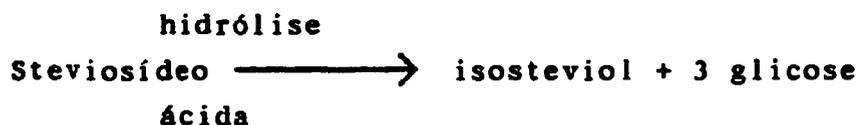
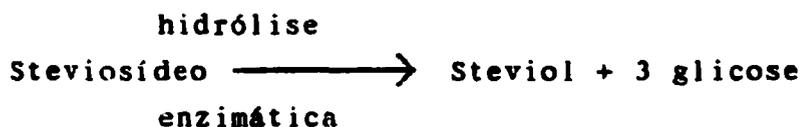
Em 1899, Bertoni foi quem descreveu pela primeira vez esta planta como *Eupatorium rebaudianum*. Entretanto, alguns anos mais tarde, o mesmo pesquisador transferiu a planta do gênero *Eupatorium* para o gênero *Stevia*, passando a denominá-la de

Stevia rebaudiana Bertoni⁶.

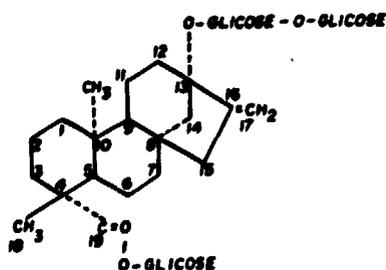
BRIDEL & LAVIEILLE⁹ empregaram o termo steviosídeo para denominar o mais importante princípio ativo obtido das folhas da *Stevia rebaudiana*. O steviosídeo foi extraído numa proporção de 60 a 65 g por quilo de folhas secas, sendo que a sua principal característica foi apresentar um poder doce 300 vezes maior do que a sacarose.

De acordo com estes pesquisadores, o steviosídeo foi facilmente hidrolisado por ação enzimática e também em meio ácido. A hidrólise enzimática foi obtida através da incubação de uma solução de steviosídeo com uma preparação enzimática de suco hepático do caramujo *Helix pomata*, por 6 dias à temperatura de 34°C. Como resultado da hidrólise, obteve-se o steviol e a liberação de 3 moléculas de D-glicose. Por hidrólise ácida (H₂SO₄ 5% a 100°C), obteve-se um isômero do steviol denominado de isosteviol e 3 moléculas de D-glicose. O isosteviol é um produto de rearranjo molecular do steviol em meio ácido. Com base nestes resultados, BRIDEL & LAVIEILLE⁹ sugeriram as fórmulas C₃₈H₆₀O₁₈ e C₂₀H₃₀O₃ para steviosídeo e steviol, respectivamente. As duas modalidades de hidrólise estão representadas pela seguinte reação:

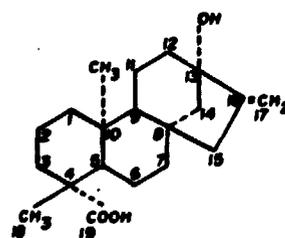




WOOD et al⁴⁹ investigando a composição do steviosídeo estabeleceram definitivamente a estrutura química deste glicosídeo. As configurações do steviol e do isosteviol foram determinada por MOSETTIG et al³⁴. As estruturas do steviosídeo e steviol estão representadas a seguir:



(a) steviosídeo



(b) steviol

O isosteviol, isômero do steviol, possui na posição do carbono-13 um grupo $-CH_3$ e no carbono-16 tem-se uma ligação $C=O$ em vez de $C=C$ como no steviol.

As folhas da *Stevia rebaudiana* como adoçante já eram empregadas pelos nativos do território paraguaio há centenas de anos, fazendo parte inclusive de sua medicina aborígene. A

Stevia rebaudiana é conhecida em guarani por várias denominações, mas, a que é frequentemente utilizada é Caa-he-ê, que significa erva-doce¹⁶.

O steviosídeo por ser 300 vezes mais doce do que a sacarose, tornou-se uma substância de grande interesse em várias partes do mundo, principalmente pela possibilidade de ser utilizado como substituto de outros adoçantes não calóricos.

No Brasil, algumas mudas de *Stevia rebaudiana* foram introduzidas no Instituto de Botânica de São Paulo no início da década de 60, passando a serem cultivadas neste Instituto com sucesso. Desde então, vários projetos de pesquisa relacionados com esta planta vêm sendo desenvolvidos. Alguns desses projetos estão relacionados com estudos de taxonomia e biologia da reprodução das espécies do gênero *Stevia*, com ênfase em *Stevia rebaudiana* Bertoni. Estudos da fisiologia e bioquímica da planta também foram realizados¹⁵.

No Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas (ITAL), foram realizados estudos sobre a extração e purificação do steviosídeo, como também, a determinação de alguns parâmetros físico-químicos e de sua estabilidade química⁴.

Em países como o Japão, o steviosídeo já é comumente usado como adoçante para uma variedade de alimentos, incluindo frutos do mar, vegetais em conservas, sobremesas, drinques suaves e itens de confeitaria^{18,46}. No Japão, as pesquisas relacionadas com a *Stevia rebaudiana* tiveram início em 1969. Nesta época, um

pesquisador japonês adquiriu algumas sementes no Instituto de Botânica de São Paulo e levou-as para serem cultivadas em solo japonês. Desde então, estudos visando o cultivo da planta, extração e purificação do steviosídeo e de outros constituintes da Stevia estão sendo realizados⁴².

Todos os glicosídeos da Stevia rebaudiana apresentam características doces, mas, existe uma grande diferença quanto a intensidade e a qualidade, sendo que o steviosídeo e o rebaudiosídeo A são os de maior importância⁴². Os glicosídeos de ocorrência natural tais como rebaudiosídeo A, rebaudiosídeo C, rebaudiosídeo D e E e dulcosídeo A são também encontrados nos extratos de folhas de Stevia, só que em quantidades menores do que o steviosídeo¹.

Uma nova modalidade de indústria dedicada a extração e purificação do steviosídeo e de outros constituintes da Stevia rebaudiana encontra-se em crescente desenvolvimento no Japão, Brasil e outros países²².

Atualmente, pesquisas envolvendo mecanismos enzimáticos estão sendo empregados com a finalidade de promover alterações na molécula do steviosídeo. Estas alterações visam aperfeiçoar a qualidade do sabor doce deste glicosídeo, buscando maior semelhança com o sabor da sacarose³².

Além de ser intensamente doce, o steviosídeo apresenta também a capacidade de inibir o crescimento de microorganismos orais, reduzindo a incidência de cáries nos dentes⁴³.

3 CARACTERÍSTICAS DO STEVIOSÍDEO PARA USO EM PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

O steviosídeo é resistente a um aquecimento de 100°C durante 5 horas em pH entre 4 e 10. Quando este glicosídeo foi submetido a um aquecimento a 95°C, a pH 2.7, por 2 horas, não houve alterações no sabor doce deste produto. Com relação a solubilidade, o steviosídeo é pouco solúvel em água e o pH não influi na mesma, mas, como seu grau de doçura é muito alto não há problemas no processamento de alimentos. Em solução alcalina forte, o steviosídeo converte-se em rebaudiosídeo B, com consequente decréscimo do sabor doce. Pode ocorrer fermentação e decomposição do steviosídeo pela ação de microorganismos, mas, como o teor adicionado em alimentos é mínimo, não se percebe alterações na acidez dos alimentos⁴².

4 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E TÓXICAS DA STEVIA REBAUDIANA

Além de suas propriedades organolépticas, a planta é também conhecida por seus efeitos fisiológicos e terapêuticos. Os extratos aquosos das folhas da *Stevia rebaudiana* são empregados não só pelo fato de apresentarem sabor doce, mas, também por possuírem algumas propriedades farmacológicas tais como: ação hipoglicêmica e efeito anticoncepcional²⁴.

4.1 EFEITOS DOS PRODUTOS DA STEVIA REBAUDIANA SOBRE O METABOLISMO DA GLICOSE

Extratos das folhas de *Stevia* foram administrados por via oral em coelhos aloxanizados, ou seja, diabéticos, provocando queda acentuada nos níveis sanguíneos de glicose⁴⁷. Este mesmo efeito já tinha sido observado, quando extratos de folhas de *Stevia* foram administrados em indivíduos adultos não diabéticos³⁵.

KELMER BRACHT et al²³ demonstraram que o steviosídeo e seus derivados (steviol e isosteviol) afetam de diversas maneiras a síntese de ATP em mitocôndrias. O steviosídeo, ao contrário dos seus derivados, demonstrou ser um fraco inibidor das funções mitocondriais.

KELMER BRACHT et al²⁴ trabalhando com preparações de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, verificaram que o

steviol e isosteviol inibiam fortemente a fosforilação oxidativa, a hidrólise do ATP e uma série de enzimas envolvidas no processo de respiração celular. O steviosídeo apresentou um efeito inibitório pequeno.

A inibição da fosforilação oxidativa e de enzimas respiratórias geralmente acarreta importantes consequências para o metabolismo celular. É um fato bem estabelecido que a inibição da síntese de ATP na cadeia respiratória das células, provoca aumento na atividade glicolítica e diminuição da gliconeogênese. Ações desta natureza no organismo intacto poderão resultar em um efeito hipoglicêmico²⁰.

YAMAMOTO et al⁵² realizando experimentos com preparações de células isoladas de túbulos da córtex renal de ratos demonstraram que o steviol e isosteviol em concentrações da ordem de 0,3 mM foram capazes de inibir em 50% a produção de glicose (gliconeogênese). Observaram, também, que o efeito inibitório era independente do precursor utilizado para a síntese de glicose, e que o steviosídeo não afetava a gliconeogênese.

De acordo com alguns pesquisadores, o não aparecimento de efeitos causados pelo steviosídeo sobre células intactas, deve-se ao fato de que este glicosídeo não difunde através da membrana plasmática em quantidades suficientes para produzir efeito. Assim sendo, ao contrário de seus derivados (steviol e isosteviol) o steviosídeo não provoca alterações no metabolismo intracelular²⁴. ISHII et al²² realizando experimentos com fígado

isolado de rato. constataram que o steviosídeo é realmente incapaz de inibir o metabolismo energético em células intactas, conforme já tinha sido observado por outros pesquisadores⁵².

4.2 PROPRIEDADE ANTICONCEPCIONAL DA STEVIA REBAUDIANA

O chá das folhas desta planta era frequentemente utilizado pelas mulheres da comunidade indígena do Paraguai para evitar a gravidez¹⁵. PLANAS & KUÉ³⁸, administrando chá de folhas desta planta em ratos, observaram uma redução em cerca de 80% na fertilidade das fêmeas. A interrupção do tratamento por um curto período de tempo induzia uma recuperação da fertilidade. Os pesquisadores levantaram a hipótese de não ser o steviosídeo a substância anticoncepcional mas, provavelmente, outras substâncias presentes no chá das folhas da Stevia rebaudiana. FARNSWORTH¹⁴ investigando os possíveis efeitos anticoncepcionais da planta, não confirmou os resultados de redução da fertilidade obtidos por PLANAS & KUÉ³⁸.

AKASHI & YOKOYAMA² administraram extrato bruto das folhas da Stevia, extrato bruto concentrado e steviosídeo na ração de ratos com o objetivo de investigar a influência destas preparações sobre a fertilidade dos animais. Dos resultados destas investigações, os pesquisadores concluíram que tanto machos como fêmeas não apresentaram alterações na fertilidade quando receberam na alimentação o extrato concentrado e o

steviosídeo. Com relação ao extrato bruto das folhas, os pesquisadores sugeriram a necessidade de obtenção de dados mais significativos para comprovar a inocuidade desta preparação.

PORTELLA & PEREIRA⁴⁰ investigaram o efeito da administração do chá das folhas de *Stevia rebaudiana* sobre a fertilidade de camundongos fêmeas adultos. A fertilidade das fêmeas foi reduzida em 14.3% após a administração intra-gástrica do infuso 6 dias antes do acasalamento. O mesmo resultado também foi observado quando o chá era administrado durante o acasalamento, tendo na redução do número de implantes uterinos a principal causa da diminuição da fertilidade.

O steviosídeo quando administrado na forma purificada não apresentou alterações sobre a fertilidade dos animais. Portanto, o mais provável é que este glicosídeo não apresente ação anticoncepcional.

4.3 EFEITOS TÓXICOS DA STEVIA REBAUDIANA

As primeiras pesquisas sobre suas propriedades farmacológicas e tóxicas tiveram início com os trabalhos desenvolvidos por KOBERT²⁵. Desde então, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de ampliar estes conhecimentos.

POMARET & LAVIEILLE³⁹ demonstraram que o steviosídeo quando foi administrado em animais sob a forma de injeção subcutânea, não apresentou nenhum efeito tóxico importante que pudesse ser detectado.

AKASHI & YOKOYAMA² constataram que extratos das folhas de Stevia quando administrados através de sonda estomacal em ratos, proporcionava dificuldades de movimentos nestes animais, levando inclusive à morte de alguns deles. Quando o steviosídeo purificado foi administrado, os animais apresentaram os mesmos sintomas anteriores, só que neste caso, não houve mortes.

A toxicidade aguda e subaguda do steviosídeo tem sido investigada extensivamente. Dos resultados destas investigações, pode-se concluir que o steviosídeo apresenta baixa toxicidade para os mamíferos^{27,2}.

YAMADA et al⁵¹ adicionaram extratos purificados de Stevia (80% de steviosídeo) na alimentação de ratos de ambos os sexos por um período de 2 anos. O experimento teve como objetivo investigar os efeitos tóxicos crônicos resultantes da ingestão dos extratos. Os animais que receberam os extratos de Stevia demonstraram crescimento retardado, apesar do consumo de

alimentos e a ingestão de água ter sido maior do que nos ratos controles. Em um grupo de animais alimentados com doses altas do extrato, o peso absoluto de órgãos como fígado, rins, coração, próstata e testículos aumentou significativamente depois de 6 meses da ingestão. As fêmeas deste grupo, apresentaram significativa redução no peso dos ovários, enquanto que o peso relativo do fígado aumentou. Com relação às alterações de peso absoluto dos órgãos, os pesquisadores não apresentaram nenhuma explicação para o fato, limitando-se à conclusão de que, apesar das modificações do peso absoluto não houve alterações significativas no peso relativo destes órgãos. Estes pesquisadores verificaram também, que em ratos machos, alimentados com extrato de Stevia, o baço aumentou significativamente. Esta alteração foi acompanhada de alta contagem de leucócitos no sangue, caracterizando um quadro de leucemia. Apesar de nenhum macho do grupo controle ter apresentado aumento do baço, os pesquisadores concluíram que esta alteração provavelmente não estivesse relacionada com a ingestão do extrato de Stevia, e sim, com a idade do animal, justificada pelo fato de que a leucemia é comumente encontrada em ratos idosos. Após seis meses de administração do extrato, algumas fêmeas apresentaram decréscimo nos níveis sanguíneos das transaminases oxalacética e pirúvica (GOT e GPT), mas estas alterações não foram relacionadas com modificações clínicas nos animais.

Em experimentos realizados com *Salmonella typhimurium* na

presença de fração microsossomal hepática. alguns pesquisadores observaram importante atividade mutagênica provocada pelo steviol³⁶. Além da atividade mutagênica, o steviol demonstrou uma atividade bactericida considerável. Os pesquisadores constataram também, que o extrato da Stevia, o steviosídeo e o isosteviol não apresentaram atividade mutagênica, seja na presença ou ausência de um ativador metabólico³⁶. Resultados semelhantes foram obtidos por FLORES et al¹⁷ com relação à capacidade mutagênica do steviosídeo. Através de estudos citogenéticos esses pesquisadores demonstraram que o steviosídeo não apresenta qualquer efeito mutagênico.

Estudos realizados com a molécula do steviol demonstraram que a presença do grupo hidroxila no carbono-13 é importante para a atividade mutagênica. O mecanismo pelo qual o steviol interage com o DNA da bactéria causando atividade mutagênica ainda é desconhecido³⁷.

Como foi descrito anteriormente, o steviol é um produto que resulta da hidrólise enzimática do steviosídeo. WINGARD et al⁴⁸ demonstraram que o steviosídeo quando incubado "in vitro" com microflora intestinal de ratos é totalmente degradado para steviol. Observou-se também, que o steviol quando administrado por via oral em ratos foi completamente absorvido pelo intestino. Esses pesquisadores sugeriram que uma degradação do steviosídeo para steviol pudesse ocorrer também no intestino do homem.

Caso se substituísse toda a ingestão de sacarose por

steviosídeo. a dose média diária de steviosídeo seria de 7.2 mg/Kg de peso/dia¹⁷. Considerando o peso médio do homem de 70 Kg. teríamos um consumo diário em torno de 504.0 mg de steviosídeo por pessoa. De acordo com estudos realizados³⁶, uma solução contendo apenas 1.0 mg/ml de steviol foi capaz de promover em uma preparação de *Salmonella typhimurium* tanto atividade mutagênica quanto atividade bactericida. Considerando portanto. a possibilidade de ocorrer a degradação "in vivo" do steviosídeo para o steviol, o indivíduo em uso deste glicosídeo estaria sujeito a alterações celulares provocadas pela presença do steviol.

Dos vários estudos que investigaram os aspectos tóxicos do steviosídeo^{27,2}, pode-se concluir que este glicosídeo apresenta baixa toxicidade para os mamíferos. mas, o mesmo não se pode dizer do steviol.

Com base no que foi descrito anteriormente, e também pelo fato do steviosídeo estar sendo amplamente usado como adoçante nas mais variadas formas no Brasil e em outras partes do mundo, investigações precisas e detalhadas a respeito da distribuição deste glicosídeo no corpo, vias de excreção e a identificação de possíveis metabólitos se fazem necessárias.

5 ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS COM USO DE TRAÇADORES RADIOATIVOS

Um traçador radioativo é um produto marcado com um nuclídeo radioativo. O emprego de substâncias marcadas com isótopos radioativos contribui para o melhor entendimento dos eventos que ocorrem no sistema biológico⁴¹.

A farmacocinética é o estudo da velocidade de transferência de fármacos e seus metabólitos nos fluidos biológicos, tecidos e excretas, relacionando os processos de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação.

O estudo farmacocinético pressupõe o sistema (organismos) dividido em um número finito de regiões, chamadas compartimentos. Os compartimentos podem ser entendidos como sendo um grupo de tecidos com características fisiológicas e físicoquímicas similares¹⁰.

Após a introdução de um traçador na corrente sanguínea, este se distribui através dos compartimentos por um processo reversível e geralmente rápido. A eliminação de uma substância de um determinado compartimento obedece a um processo de primeira ordem, isto é, a quantidade de substância que sai na unidade de tempo é proporcional à quantidade nele presente, definindo assim a propriedade de linearidade de compartimentos. A excreção de um fármaco é considerada um processo irreversível, o que caracteriza um mecanismo de eliminação¹¹.

Com base nos dados obtidos experimentalmente para as curvas de decaimento plasmático e corpo inteiro, excreções fecal e

urinária, as constantes de transferências do traçador entre os compartimentos podem ser determinadas através de programas específicos de computador³⁰. A constante de velocidade (K) caracteriza a velocidade de transferência do fármaco de um compartimento para outro. Desta forma, K_{ab} é o coeficiente de transferência que representa a fração do fármaco contida no compartimento a que é transferida para o compartimento b na unidade de tempo.

Com base nessas constantes, os programas computacionais promovem a simulação de um modelo de distribuição entre os compartimentos por meio de equações diferenciais, que prevêem o comportamento do sistema biológico em estudo, o que só terá validade se estiver em concordância com os parâmetros determinados experimentalmente.

II OBJETIVOS

Estabelecidas as condições de marcação do steviosídeo com o iodo-131, propusemo-nos a estudar em ratos Wistar:

1. a distribuição biológica, a excreção urinária e fecal do ^{131}I -steviosídeo e seus metabólitos em tempos pré-determinados;
2. a possível degradação "in vivo" do steviosídeo para steviol após injeção endovenosa;
3. a identificação de metabólitos do steviosídeo na urina e bile, com especial atenção para o steviol;
4. a elaboração de um modelo cinético para o ^{131}I -steviosídeo com a determinação das constantes de transferência entre os compartimentos.

III MATERIAL E MÉTODOS

1 MATERIAL

1.1 REAGENTES

- . acetato de etila. Merck.
- . anisaldeído, Merck.
- . etanol. Merck.
- . heparina. 5000 UI/ml. Roche.
- . iodo-131. IPEN-CNEN/SP.
- . metanol, Merck.
- . peróxido de hidrogênio (H_2O_2) - 30%. Merck.
- . steviosídeo e steviol, gentilmente fornecidos pelo Prof. Mauro Alvarez da Universidade Estadual de Maringá, PR.
- . uretana, Sigma.

1.2 OUTROS

- . filtros Millipore, 22 um.
- . papel Whatman no.1.
- . placa para cromatografia em camada delgada, DC-Alufolien - sílica gel 60. Merck.

1.3 ANIMAIS

Foram utilizados nos experimentos *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, machos, pesando entre 200 e 300 gramas, alimentados com ração comercial e água "ad libitum", fornecidos pelo biotério do IPEN/CNEN/SP.

1.4 EQUIPAMENTOS

- Balança Helmac. HM 100;
- Centrífuga de micro-hematócrito, CELM, Brasil;
- Centrífuga Sorval, GLC-L, USA;
- Coluna de HPLC, Nucleosil C-18, 25,0 x 0.4 cm. fase reversa;
- Contadores de radioatividade:
 - . Cintilador automático, ANSR, Abbot. USA;
 - . Cintilador de poço Berthold, MAG 312, Alemanha;
 - . Contador de corpo inteiro. Harshaw Chemical Company. USA;
 - . Curietest-Siemens. Alemanha;
 - . Detetor Berthold Nuclear Spectrometer, LB 2040, Alemanha;

- Espectrofotômetro infravermelho Perkin-Elmer. Mod. 1760. USA:
- Gaiolas metabólicas:
- Ponto de fusão em aparelho Mettler;
- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), CG-480C. Brasil;

2 MÉTODOS

2.1 DETERMINAÇÃO DA PUREZA DO STEVIOSÍDEO E DO STEVIOL

O grau de pureza destas substâncias foi determinado pelos seguintes métodos:

a) Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram usadas placas delgadas de sílica gel e como eluente uma mistura de clorofórmio: metanol: H₂O (15:6:1). Como revelador utilizou-se uma solução de anisaldeído 2% em ácido acético 0,1 M. Após o tempo de corrida, as placas foram retiradas do solvente e deixadas em temperatura ambiente até a secagem. Em seguida, o revelador foi aplicado sobre as placas e estas foram colocadas em uma estufa a 100°C por 5 minutos³¹.

b) Ponto de fusão

Foram determinados em aparelho Nettler .

c) Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As amostras e os padrões foram eluídos em coluna de fase reversa Nucleosil C18 (0.4 x 25 cm), utilizando-se uma mistura de metanol e NaOH 5.0 mM (65:35) como fase móvel com um fluxo constante de 1.5 ml/min sob 260 atm de pressão e temperatura ambiente. A detecção dos padrões não radioativos foi feita utilizando um filtro de 210 nm³.

2.2 MARCAÇÃO DO STEVIOSÍDEO E STEVIOL COM IODO-131

O método empregado para a iodação das substâncias baseou-se no trabalho realizado por MATHOR et al²⁹. Foram estudados os efeitos de alguns parâmetros tais como: massa do steviosídeo, pH da reação, tempo de reação e quantidade de H₂O₂ sobre o rendimento de marcação. Após este estudo, as condições ótimas de marcação do steviosídeo foram as seguintes: para uma massa de 10.0 mg de steviosídeo dissolvidos em 2.0 ml de HCl 0,01 M; foram adicionados 0.05 ml de peróxido de hidrogênio 30% e 37,0 MBq de Na¹³¹I. A mistura foi aquecida em banho maria (90° C) por 15 minutos e em seguida adicionou-se 0.1 ml de uma solução de tiosulfato de sódio a 5% com a finalidade de interromper a reação. Após o resfriamento da solução, foram adicionados 2.0

ml de tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0).

O rendimento de marcação foi determinado por eletroforese em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 5,4). Empregou-se na eletroforese fita de papel Whatman no. 1 (23,3 x 2,0 cm) e uma tensão de 300 volts por um período de 60 minutos.

Devido à pouca solubilidade do steviol em água, a marcação foi realizada dissolvendo-se 2,0 mg de steviol em 1,0 ml de éter etílico (solução A). Em outro tubo, 1,00 ml de cloreto de iodo (ICL) foi misturado com 37,0 MBq de Na^{131}I (solução B). Desta solução, foram realizadas 3 extrações do $\text{Cl}^{131}\text{I}^{33}$ com 2,0 ml de éter etílico, sendo o volume de cada extração (2,0 ml) transferido para o frasco contendo a solução A. Adicionou-se 1 g de sulfato de sódio a esta solução, para em seguida deixá-la em repouso por 60 minutos na ausência de luz. Após o período de reação, a solução foi filtrada e submetida a uma corrente de nitrogênio (N_2) até a secagem. O ^{131}I -steviol foi redissolvido em 3,0 ml de uma solução NaOH 0,01 M.

O rendimento de marcação foi determinado do mesmo modo que foi descrito para o steviosídeo. O ^{131}I -steviol foi utilizado como padrão tanto para o experimento com HPLC quanto para cromatografia em camada delgada.

2.3 ESPECTRO INFRAVERMELHO DO STEVIOSÍDEO IODADO

Para a determinação do espectro infravermelho, o steviosídeo foi iodado com iodo não radioativo (^{127}I) nas mesmas condições descritas anteriormente. Esta análise teve como objetivo verificar a presença de estiramento devido a ligação carbono-iodo, bem como demonstrar possível modificação na região de estiramento da ligação dupla carbono-carbono, o que evidenciaria a incorporação de átomos de iodo na molécula do steviosídeo. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr na proporção de 1:200 (amostra: KBr), respectivamente.

2.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO STEVIOSÍDEO MARCADO COM ^{131}I IODO

Uma parte do ^{131}I -steviosídeo foi mantida em temperatura ambiente por 7 dias, a outra parte foi acondicionada em refrigerador a 4°C pelo mesmo período. O controle de pureza radioquímica do produto marcado foi realizado diariamente para as duas situações.

2.5 ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DO ^{131}I -STEVIOSÍDEO

Foram utilizados seis ratos para cada grupo estudado. Os animais foram mantidos com alimentação racionada e água "ad libitum" por 16 horas antes do início dos experimentos.

Os ratos foram imobilizados dentro de uma caixa de acrílico, de tal modo, que a cauda do animal ficava posicionada do lado externo do recipiente. Com o emprego deste procedimento, pode-se injetar o ^{131}I -steviosídeo (1,10 MBq) na veia da cauda sem o uso de anestésico. Os tempos pesquisados foram 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 minutos e 24 horas após a injeção do produto marcado. Transcorrido o tempo estabelecido para cada grupo, os ratos foram sacrificados por decapitação e o sangue coletado em frascos heparinizados.

Após a coleta de sangue, foram retirados os seguintes órgãos: coração, pulmão, fígado, baço, rins, estômago, intestinos delgado e grosso, testículos, parte do músculo da pata traseira e também a tireóide. Os tecidos removidos foram lavados com água, pesados e a radioatividade determinada.

Para a obtenção do plasma, 1,0 ml de sangue foi centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos. Utilizou-se uma alíquota de 0,3 ml do plasma para a determinação da radioatividade, enquanto que 0,2 ml de sangue foram utilizados para a determinação do hematócrito.

Os resultados referentes à captação de radioatividade pelos tecidos foram expressos em percentual de dose injetada por

órgão (% de dose/órgão). Os cálculos foram efetuados tendo como referência um padrão que continha exatamente a mesma dose injetada nos animais, ou seja, 0.1 ml contendo 1.10MBq de ^{131}I -steviosídeo. As doses foram medidas utilizando-se um calibrador de dose (Curietest). Para cada órgão estudado, considerou-se a Média e o Desvio Padrão ($x \pm \text{DP}$).

Para a determinação do percentual da dose injetada, presente no plasma total, levou-se em consideração a volemia e o volume plasmático de cada animal. Utilizou-se para a realização dos cálculos o mesmo padrão citado anteriormente, sendo os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão. A volemia foi determinada de acordo com LEE & BLAUFOX²⁶ enquanto que o volume plasmático foi calculado conforme descrito por GANONG¹⁹, tendo sido utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Volemia} = \text{peso do animal} \times 0,06 + 0,77$$

$$\text{Volume plasmático} = \frac{\text{volemia (ml)} \times (100 - \text{Hematócrito real})}{100}$$

O hematócrito real (Htr) foi determinado de acordo com a expressão descrita por TAUXE et al⁴⁵.

$$\text{Htr} = \text{leitura obtida do hematócrito} \times 0,91 \times 0,96$$

2.6 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE RETENÇÃO DE ^{131}I -STEVIOSÍDEO NO CORPO INTEIRO

A determinação da radioatividade presente no corpo inteiro do animal foi estudada em um grupo de 6 ratos. Injetou-se 0,1 ml de ^{131}I -steviosídeo (1,10 MBq) por via endovenosa.

Após a administração da dose, os animais foram mantidos em gaiolas individuais. As gaiolas foram preparadas de tal modo, que as fezes e urina eliminados durante o experimento, pudessem ser recolhidas antes de cada medida, garantindo assim, níveis baixos de radiação de fundo nas gaiolas²⁸. As medidas de radiação foram realizadas em um contador de corpo inteiro para os tempos de 1/2, 1, 2, 4, 6, 16, 24, 30 e 48 horas após a injeção. Para cada medida efetuou-se a contagem de um padrão simulando o corpo do animal.

Os cálculos do percentual de retenção de ^{131}I -steviosídeo no corpo inteiro foram efetuados em relação ao padrão que continha exatamente a mesma dose injetada nos animais. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão.

2.7 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE RADIOATIVIDADE ELIMINADO NA BILE

Os ratos (n=3) foram anestesiados com uretana para que os ductos biliares pudessem ser canulados através de um procedimento cirúrgico, conforme descrito por ATALLAH & GLENN⁵. Após a administração da dose de ¹³¹I-steviosídeo por via endovenosa, a bile foi coletada em intervalos de 60 minutos por 4 horas. Os cálculos foram realizados tendo como padrão a mesma dose injetada nos animais. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão ($x \pm DP$).

2.8 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE RADIOATIVIDADE ELIMINADO NAS FEZES E URINA

Um grupo de seis animais foi mantido em gaiolas metabólicas individuais com alimento e água "ad libitum". Durante um período de 24 horas após a injeção de ¹³¹I-steviosídeo as fezes e a urina foram coletadas. As fezes foram colocadas em uma estufa a 50°C para a secagem, sendo em seguida pesadas e trituradas. A urina coletada teve o volume total medido. A radioatividade das amostras (fezes e urina) foi então determinada⁷.

Os resultados obtidos foram calculados tendo como referência o padrão de dose injetada e expressos como Média \pm DP ($x \pm DP$).

2.9 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE BILE E URINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

As amostras de bile e urina coletadas dos animais conforme descrito nos itens 2.7. e 2.8. respectivamente. foram submetidas a análises em HPLC para a identificação dos metabólitos. As condições da cromatografia foram as descritas anteriormente (2.1 C). sendo que as alíquotas foram coletadas em intervalos de 15 segundos para posterior contagem da radioatividade e a determinação do perfil radioativo.

Antes de serem submetidas ao processo de cromatografia as amostras passaram por um tratamento envolvendo extrações com metanol: etanol (1:1) e acetato de etila¹². Verificou-se depois, que os resultados obtidos das amostras tratadas foram idênticos aos obtidos com as amostras que não sofreram tratamento. Assim sendo, nos experimentos subsequentes o tratamento foi dispensado, realizando-se apenas a filtração das amostras em membrana Millipore.

Os resultados obtidos para os tempos de retenção dos compostos radioativos presentes nas amostras foram comparados com os tempos de retenção dos padrões de ¹³¹I-steviosídeo e ¹³¹I-steviol.

2.10 ELABORAÇÃO DO MODELO CINÉTICO PELO COMPUTADOR

O tratamento matemático dos dados referentes às curvas de decaimento plasmático e corpo inteiro. captação de radioatividade pela tireóide e excreções fecal e urinária foi efetuado por computador utilizando o programa ANACOMP versão 1.0³⁰.

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Considerando a homogeneidade das variâncias, os resultados obtidos foram analisados pelo teste t de Student para amostras independentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p \leq 0.05$.

IV RESULTADOS

1 DETERMINAÇÃO DA PUREZA DO STEVIOSÍDEO E DO STEVIOL

a) Cromatografia em camada delgada

Tanto o steviosídeo quanto o steviol apresentaram mancha única em c.c.d., tendo como eluente uma mistura de clorofórmio, metanol e H₂O (15:6:1). Os valores de R_f foram 0.14 e 0.78 para steviosídeo e steviol, respectivamente.

b) Determinação do ponto de fusão

Os valores foram os seguintes:

steviosídeo = 201-202°C

steviol = 210-212°C.

c) Cromatografia líquida de alta eficiência

A figura 1 mostra o perfil de eluição do steviol (A) e do steviosídeo (B) em sistema de HPLC. Os tempos de retenção foram 1.5 min e 6,0 min para steviol e steviosídeo, respectivamente.

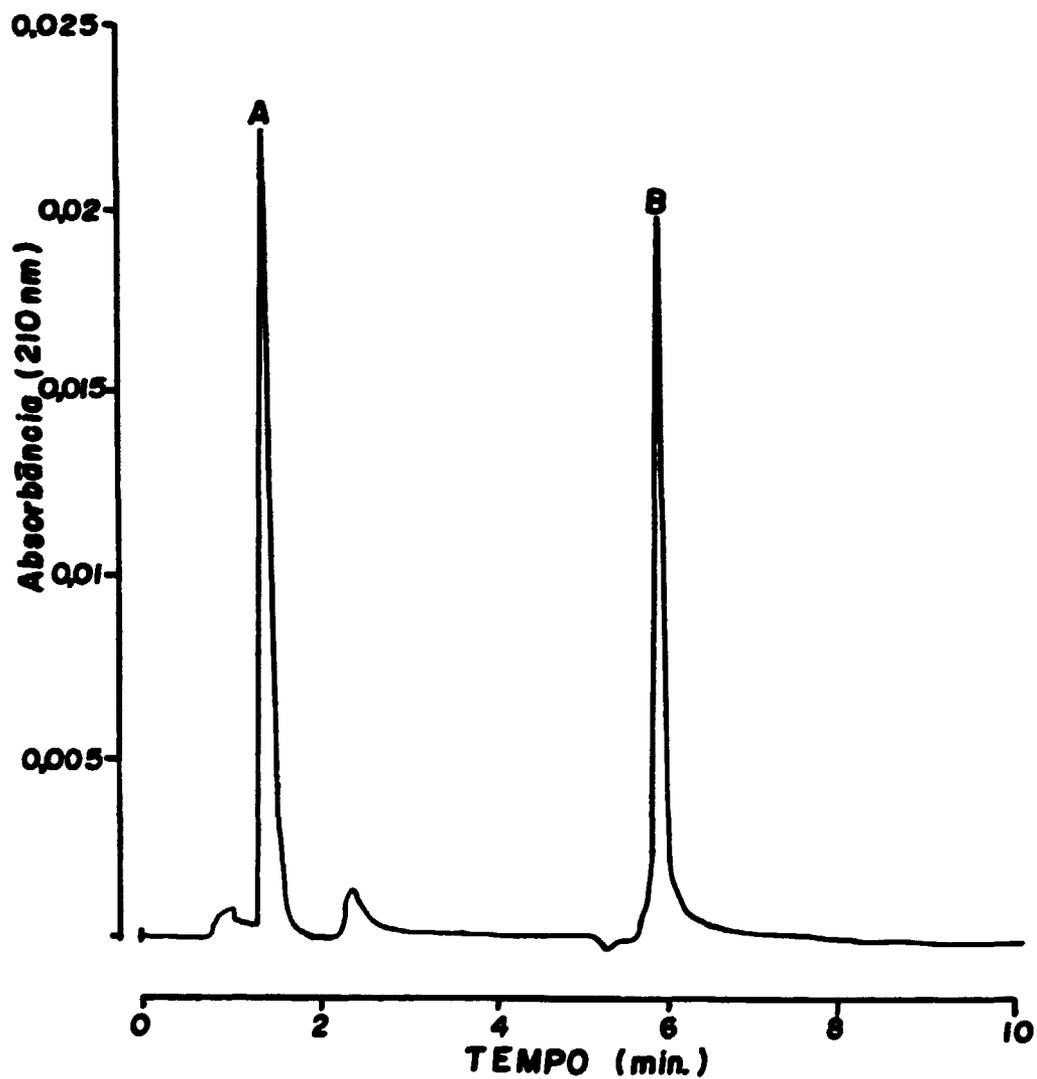


Figura 1 - Perfil de eluição obtido em HPLC de steviol (A) e steviosídeo (B)

2 ESPECTRO INFRAVERMELHO DO ^{127}I -STEVIOSÍDEO

A figura 2 mostra os espectros do steviosídeo não iodado (A) e iodado (B). Observa-se pela figura 2B o aparecimento de banda a 590 cm^{-1} devido ao estiramento de ligação carbono-iodo. Também pode ser observado alterações na região de absorção relativo ao estiramento de ligação $\text{C} = \text{C}$ ($1600\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$).

3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MARCAÇÃO DO STEVIOSÍDEO COM ^{131}I

Estudamos os efeitos de alguns parâmetros, tais como: massa do steviosídeo, pH de reação, tempo de reação e volume de H_2O_2 usado como agente oxidante, sobre o rendimento de marcação. Apesar do pequeno número de experimentos realizados, os resultados mostram que nas condições estudadas a variação da massa do steviosídeo, do tempo de reação e do volume de H_2O_2 não influenciaram de maneira significativa o rendimento de marcação. Por outro lado, com relação ao pH da reação, observou-se uma sensível redução do rendimento de marcação em valores de pH acima de 2.0. Os dados obtidos estão demonstrados nas Tabelas I, II, III e IV.

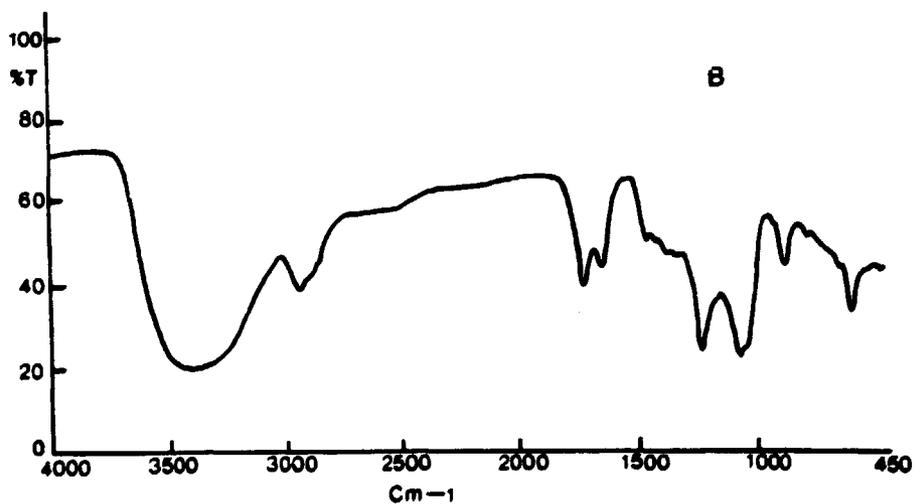
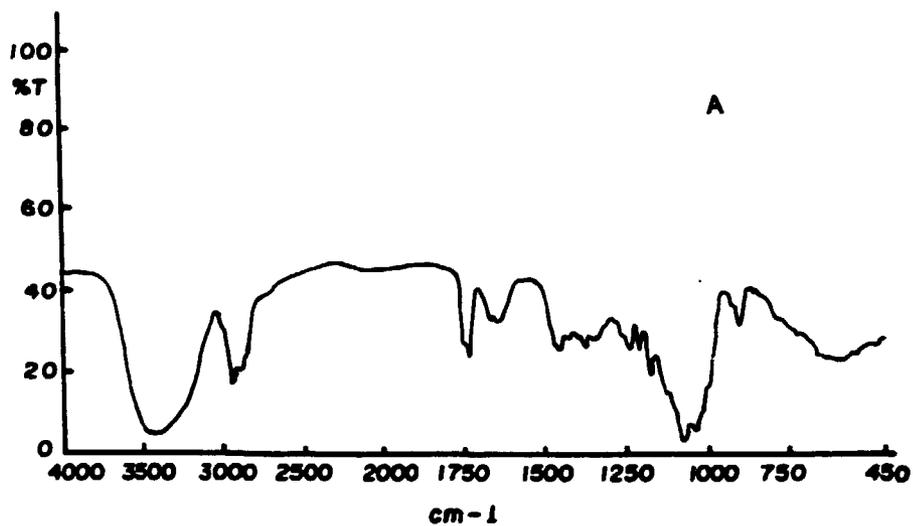


Figura 2 - Espectros infravermelho do steviosídeo não iodado (A) e do steviosídeo iodado (B). Registro em janela de KBr.

TABELA I

INFLUÊNCIA DA MASSA DO STEVIOSÍDEO SOBRE A MARCAÇÃO

Massa do steviosídeo (mg)	Atividade do Iodo-131 (MBq)	Tempo de reação (min)	Volume de H ₂ O ₂ (ml)	pH de reação	rendimento de marcação (%)
10,0	37,0	15,0	0,25	2,0	98,0
20,0	37,0	15,0	0,25	2,0	98,2
30,0	37,0	15,0	0,25	2,0	97,5
40,0	37,0	15,0	0,25	2,0	97,7

TABELA II

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE REAÇÃO SOBRE A MARCAÇÃO

Massa do steviosídeo (mg)	Atividade do Iodo-131 (MBq)	Tempo de reação (min)	Volume de H ₂ O ₂ (ml)	pH de reação	rendimento de marcação (%)
10,0	37,0	10,0	0,25	2,0	96,4
10,0	37,0	15,0	0,25	2,0	98,2
10,0	37,0	20,0	0,25	2,0	96,8
10,0	37,0	30,0	0,25	2,0	97,0

TABELA III

INFLUÊNCIA DO VOLUME DE H₂O₂ UTILIZADO SOBRE A MARCAÇÃO

Massa do steviosídeo (mg)	Atividade do Iodo-131 (MBq)	Tempo de reação (min)	Volume de H ₂ O ₂ (ml)	pH de reação	rendimento de marcação (%)
10,0	37,0	15,0	0,05	2,0	98,0
10,0	37,0	15,0	0,15	2,0	98,0
10,0	37,0	15,0	0,25	2,0	98,2
10,0	37,0	15,0	0,35	2,0	97,8

TABELA IV

INFLUÊNCIA DO pH DA REAÇÃO SOBRE A MARCAÇÃO

Massa do steviosídeo (mg)	Atividade do Iodo-131 (MBq)	Tempo de reação (min)	Volume de H ₂ O ₂ (ml)	pH de reação	rendimento de marcação (%)
10,0	37,0	15,0	0,05	1,0	97,6
10,0	37,0	15,0	0,05	2,0	98,2
10,0	37,0	15,0	0,05	3,0	87,9
10,0	37,0	15,0	0,05	4,0	76,0
10,0	37,0	15,0	0,05	5,0	67,2

Com os resultados obtidos através dos estudos destes parâmetros, o método de marcação com iodo-131 foi padronizado nas seguintes condições:

massa do steviosídeo.....	10,0	mg
tempo de reação.....	15,0	minutos
volume de H ₂ O ₂	0,05	ml
pH de reação.....	2,0	
atividade de ¹³¹ I	37,0	MBq
atividade específica	3,7	MBq/mg

4 ESTABILIDADE DO STEVIOSÍDEO MARCADO COM IODO-131

O ¹³¹I-steviosídeo quando foi mantido à 4°C permanecia estável por um período de 7 dias, ou seja, mantinha o teor de pureza radioquímica (98%) obtido na marcação. Por outro lado, quando o produto foi deixado em temperatura ambiente pelo mesmo período, constatou-se uma redução acentuada nos níveis de pureza radioquímica, registrando para esta condição um teor de pureza da ordem de 72%.

5 ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DO ^{131}I -STEVIOSÍDEO

5.1 PLASMA

Os níveis de radioatividade presentes no plasma em diversos tempos após a administração do ^{131}I -steviosídeo estão demonstrados na Tabela V. Observa-se uma redução acentuada destes níveis nos 30 minutos iniciais. No intervalo compreendido entre 30 a 90 min, não foi observado alteração significativa nos níveis plasmáticos de radioatividade, enquanto que no período de 90 minutos a 24 horas após a injeção volta-se a registrar significativa queda nos níveis de radioatividade no plasma.

5.2 TECIDOS

Os resultados da distribuição temporal da radioatividade nos tecidos estão demonstrados na Tabela VI.

Observa-se que os níveis de radioatividade em tecidos como coração, pulmão, estômago, baço, testículos e músculos foram menores do que 1,80% da dose injetada durante todo o experimento, diferentemente do observado para os demais tecidos. Na tireóide, este nível atingiu 5,98% da dose injetada 24 horas após a injeção, enquanto que nos rins, o nível mais alto de radioatividade foi observado 3 minutos após a

administração do ^{131}I -steviosídeo. Os mais altos níveis de radioatividade nos tecidos foram observados no fígado e no intestino delgado 10 e 120 minutos após a injeção, respectivamente. A radioatividade no intestino grosso aumentou significativamente no intervalo de 120 a 240 minutos após a injeção.

TABELA V

NÍVEIS PLASMÁTICOS DE RADIOATIVIDADE EM DIVERSOS TEMPOS APÓS
A ADMINISTRAÇÃO DE ^{131}I -STEVIOSÍDEO

Tempo (min)	Porcentagem da dose administrada plasma total
1	51,54 ± 6,70
3	40,74 ± 4,10
5	20,10 ± 1,61
10	16,22 ± 2,74
15	9,71 ± 1,49
30	6,16 ± 1,04
45	5,71 ± 0,70
60	5,60 ± 0,70
90	5,03 ± 0,78
120	4,51 ± 0,29
240	4,02 ± 0,36
1440	0,83 ± 0,14

Resultados expressos como Média ± DP (n = 6) para cada tempo.
p ≤ 0,0001 para o intervalo compreendido entre 1 a 30 minutos.
Não houve diferença significativa entre os valores
compreendidos no intervalo de 30 a 90 minutos.
p ≤ 0,001 para o intervalo compreendido entre 90 a 1440
minutos.

TABELA VI
NÍVEIS DE RADIOATIVIDADE PRESENTES NOS TECIDOS APÓS INJEÇÃO DE ¹³¹I-STEVIOSÍDEO

Tecidos	porcentagem de dose injetada presente no órgão									
	1min	3min	5min	10min	30min	45min	60min	120min	240min	1440min
Coração	0,59±0,01	0,56±0,06	0,36±0,007	0,20±0,005	0,16±0,01	0,15±0,02	0,13±0,03	0,07±0,008	0,10±0,02	0,02±0,006
Pulmão	1,78±0,33	1,25±0,24	0,79±0,09	0,61±0,13	0,36±0,09	0,28±0,02	0,59±0,20	0,17±0,04	0,23±0,03	0,06±0,01
Estômago	0,42±0,10	0,55±0,06	0,38±0,09	0,40±0,08	0,34±0,04	0,42±0,08	0,40±0,04	0,61±0,13	0,89±0,22	0,05±0,03
Baço	0,34±0,04	0,33±0,05	0,21±0,01	0,09±0,02	0,06±0,01	0,09±0,01	0,10±0,01	0,07±0,01	0,08±0,01	0,02±0,00
Testículos	0,18±0,03	0,20±0,03	0,16±0,02	0,17±0,03	0,17±0,01	0,18±0,01	0,10±0,02	0,14±0,02	0,24±0,03	0,04±0,01
Músculos	0,09±0,01	0,12±0,02	0,06±0,01	0,09±0,02	0,04±0,009	0,07±0,01	0,05±0,01	0,05±0,01	0,07±0,01	0,007±0,01
Rins	4,34±0,82	5,84±0,58	2,54±0,31	2,35±0,85	1,32±0,30	0,77±0,15	0,84±0,15	0,59±0,06	0,48±0,06	0,14±0,03
Fígado	28,20±2,53	38,20±3,68	42,60±6,04	44,60±4,75	30,50±1,35	14,35±0,85	9,90±0,92	4,77±0,58	4,05±0,38	0,51±0,08
I. delgado	5,22±0,39	6,70±0,42	16,84±1,06	18,35±2,80	42,02±6,23	57,20±11,0	59,30±3,60	65,80±6,29	16,30±3,80	5,02±0,57
I. grosso	0,33±0,06	0,46±0,11	0,56±0,05	0,41±0,08	0,42±0,10	0,46±0,06	0,60±0,12	1,10±0,48	40,00±6,23	10,7±0,23
Tireóide	0,12±0,01	0,14±0,01	0,06±0,01	0,08±0,01	0,11±0,02	0,39±0,07	0,26±0,09	0,84±0,33	2,21±0,61	5,98±1,42
Plasma/total	51,14±6,70	40,74±4,10	20,10±1,61	16,22±2,74	6,16±1,04	5,71±0,70	5,60±0,70	4,51±0,29	4,02±0,36	0,83±0,14

Os valores representam a Média ± Desvio padrão para os grupos de 6 animais.

5.3 BILE

Como pode ser observado na figura 3, a radioatividade eliminada na bile 120 minutos após a injeção do ^{131}I -steviosídeo foi de aproximadamente 52% da dose injetada, atingindo cerca de 60% 240 minutos após a injeção.

5.4 INTESTINO DELGADO

Após 120 minutos da injeção do ^{131}I -steviosídeo, a maior parte da radioatividade presente no intestino delgado (51%) estava localizada no conteúdo intestinal, enquanto que cerca de 17,0% da dose encontrava-se na parede do intestino como pode ser observado pela figura 4.

5.5 FEZES E URINA

Observa-se na Tabela VII que os resultados das excreções urinária e fecal foram muito semelhantes, registrando-se a eliminação de 34,70% e de 35,30% da dose injetada na urina e fezes, respectivamente.

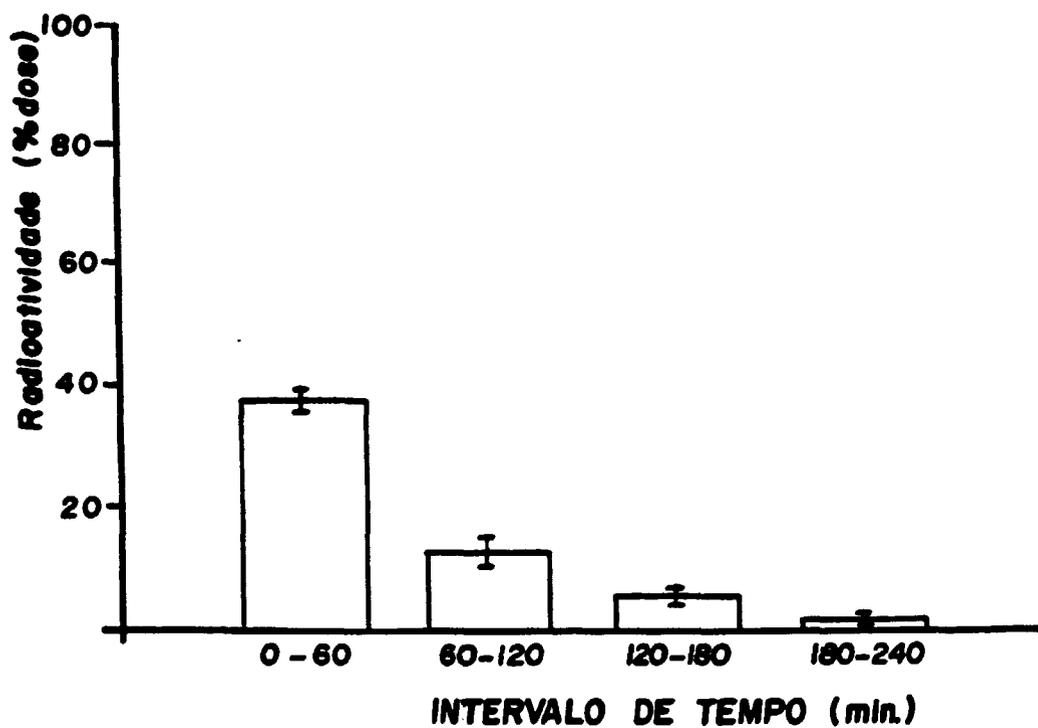


Figura 3- Porcentagem da dose injetada de radioatividade eliminada na bile.

Cada coluna representa a Média \pm Desvio Padrão (n=3). Após a injeção endovenosa de ^{131}I -steviosídeo, a bile foi coletada em intervalos de 60 minutos por 4 horas.

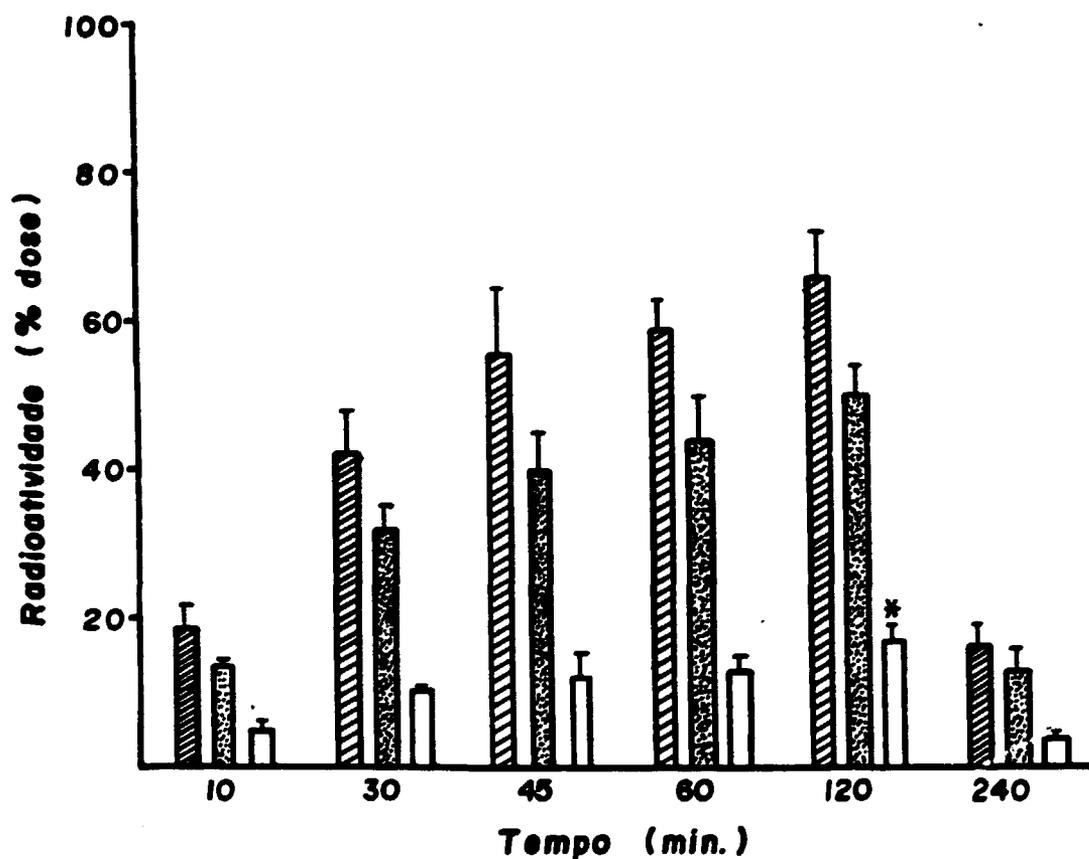


Figura 4- Porcentagem da dose injetada de ^{131}I -steviosídeo presente no intestino delgado.

Intestino delgado com conteúdo  : conteúdo intestinal  : intestino delgado vazio .

Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão (n = 6). * $p \leq 0.05$ quando comparado com os demais tempos para o intestino delgado vazio.

TABELA VII

PORCENTAGEM DA DOSE ADMINISTRADA PRESENTE NA URINA E FEZES
APÓS INJEÇÃO I. V. DE ^{131}I -STEVIOSÍDEO

Tempo (horas)	Urina (acumulada)	Fezes (acumulada)
24	34,70 \pm 6,30	35,30 \pm 3,55

Os valores representam a Média \pm Desvio Padrão (n=6).

5.6 CORPO INTEIRO

A Tabela VIII mostra os níveis de radioatividade presentes no corpo inteiro após a injeção i.v. de ^{131}I -steviosídeo em diferentes tempos investigados.

6 IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Os resultados das análises de bile e urina por HPLC estão demonstrados na figura 5. Observa-se pela figura 5B que o steviol apareceu como o principal metabólito (47,3%) presente na bile, enquanto que o steviosídeo representou 37,3% e os 15,4% da radioatividade remanescente foi devido a um metabólito não identificado. Observa-se pela figura 5C que na urina estão presentes o steviosídeo e um metabólito radioativo não identificado. O tempo de retenção observado para este metabólito (8,0 min) coincide com o encontrado para o metabólito não identificado presente na bile. O tempo de retenção dos metabólitos foi comparado com o tempo de retenção dos compostos marcados steviol e steviosídeo (figura 5A).

TABELA VIII

PORCENTAGEM DA DOSE ADMINISTRADA PRESENTE NO CORPO INTEIRO
APÓS INJEÇÃO DE ^{131}I -STEVIOSÍDEO

Tempo (horas)	Porcentagem de dose
0.5	92,40 \pm 5.74
1,0	87,50 \pm 4.22
2,0	84,50 \pm 4,43
4,0	76,50 \pm 8,50
6,0	71,30 \pm 8,00
16,0	31,80 \pm 1,83
24,0	28,50 \pm 2,56
30,0	24,30 \pm 3,21
48,0	17,20 \pm 2,55

Os valores representam a Média \pm Desvio Padrão (n=6).

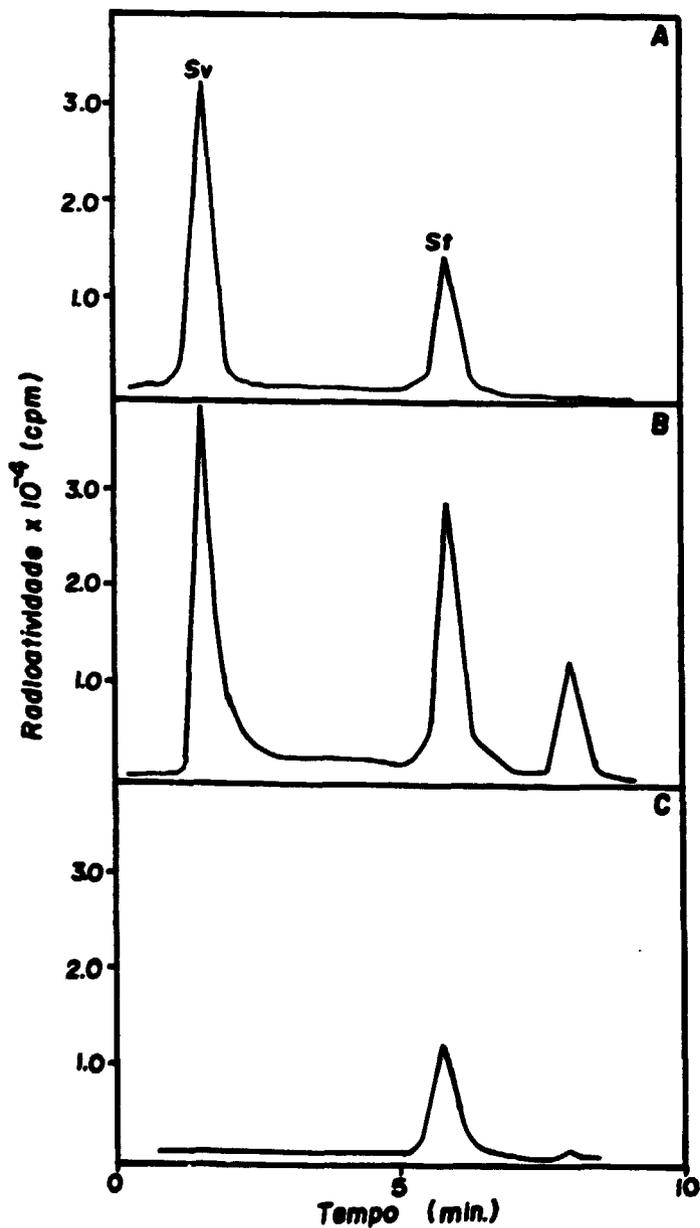


Figura 5- Perfil obtido em cromatografia líquida de alta eficiência de:

A-padrões de steviol (SV) e steviosídeo (St) marcados com ¹³¹I.

B e C - amostras de bile e urina, respectivamente, coletadas por 90 minutos após a injeção de ¹³¹I-steviosídeo.

7 MODELO CINÉTICO

Para a elaboração do modelo cinético foram utilizados os dados experimentais da curva plasmática, curva de corpo inteiro, captação de iodeto pela tireóide e os resultados das excreções fecal e renal. O modelo proposto para a distribuição do ^{131}I -steviosídeo está demonstrado na figura 6.

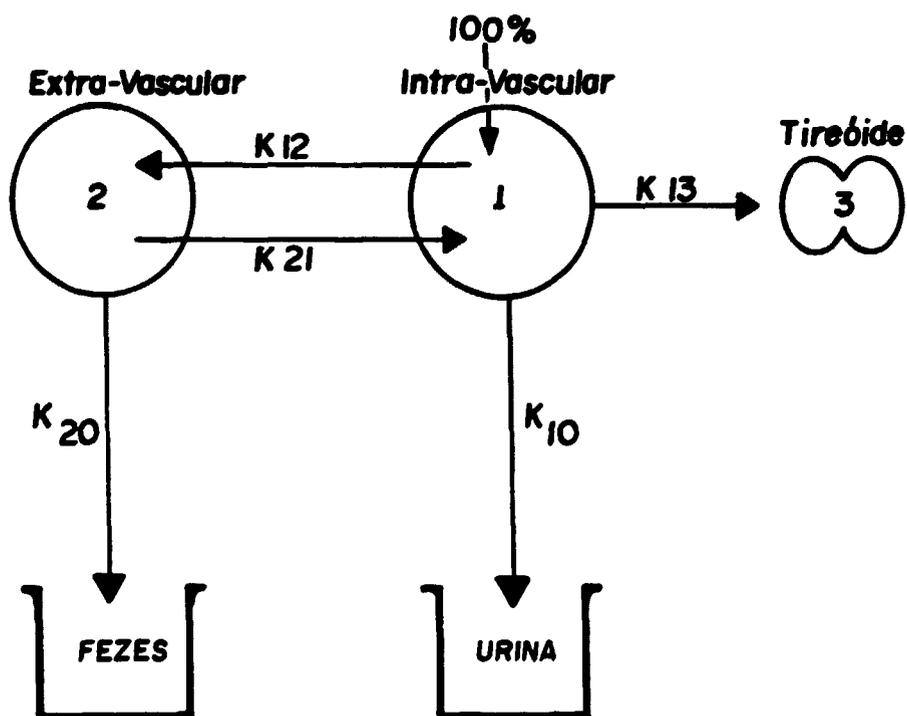


Figura 6- Modelo Cinético proposto para a distribuição do ^{131}I -steviosídeo

De acordo com este modelo, o sistema de equações diferenciais lineares de primeira ordem que descreve a evolução da substância marcada na unidade de tempo, apresenta coeficientes constantes do tipo:

$$\frac{df_1(t)}{dt} = - (k_{10} + K_{12} + K_{13}) f_1(t) + K_{21} f_2(t)$$

$$\frac{df_2(t)}{dt} = k_{12} f_1(t) - (K_{20} + K_{21}) f_2(t)$$

$$\frac{df_3(t)}{dt} = k_{13} f_1(t)$$

onde $f_i(t)$ corresponde à atividade no compartimento "i" no tempo "t";

$df_i(t)/dt$ representa a variação da função "i" (compartimento i) no decorrer do tempo "t".

As condições iniciais são as seguintes:

$$f_1(t = 0) = 100\%$$

$$f_2(t = 0) = 0$$

$$f_3(t = 0) = 0$$

Assim, no instante inicial ($t=0$), toda a substância marcada encontra-se no compartimento intra-vascular ou central(1).

O programa ANACOMP permitiu calcular os valores dos coeficientes de transferências (K) envolvidos no modelo.

Valores de K (horas⁻¹)

$$K (1,2) = 18,2277 \pm 0.0004$$

$$K (2,1) = 1,1156 \pm 0.1082$$

$$K (1,3) = 0,0860 \pm 0.0020$$

$$K (1,0) = 0,5360 \pm 0.0018$$

$$K (2,0) = 0,0343 \pm 0.0016$$

Com estes dados, os valores de meia-vida biológica ($t_{1/2}$) foram calculados para cada compartimento. Assim tem-se:

$$t_{1/2} (1 \rightarrow 2) = 0.693/18,222 = 0,04 \text{ horas}$$

$$t_{1/2} (2 \rightarrow 1) = 0.693/1.115 = 0,62 \text{ horas}$$

$$t_{1/2} (1 \rightarrow 0) = 0.693/0,536 = 1,30 \text{ horas}$$

$$t_{1/2} (2 \rightarrow 0) = 0.693/0,034 = 20,40 \text{ horas}$$

$$t_{1/2} (1 \rightarrow 3) = 0.693/0,086 = 8,06 \text{ horas}$$

De acordo com o modelo cinético proposto foi possível obter uma correlação entre os valores observados e os calculados para as curvas de decaimento plasmático e corpo inteiro, conforme pode ser observado nas figuras 7 e 8 respectivamente. A mesma correlação também foi observada para os valores de eliminação fecal e urinária, conforme está demonstrado na Tabela IX.

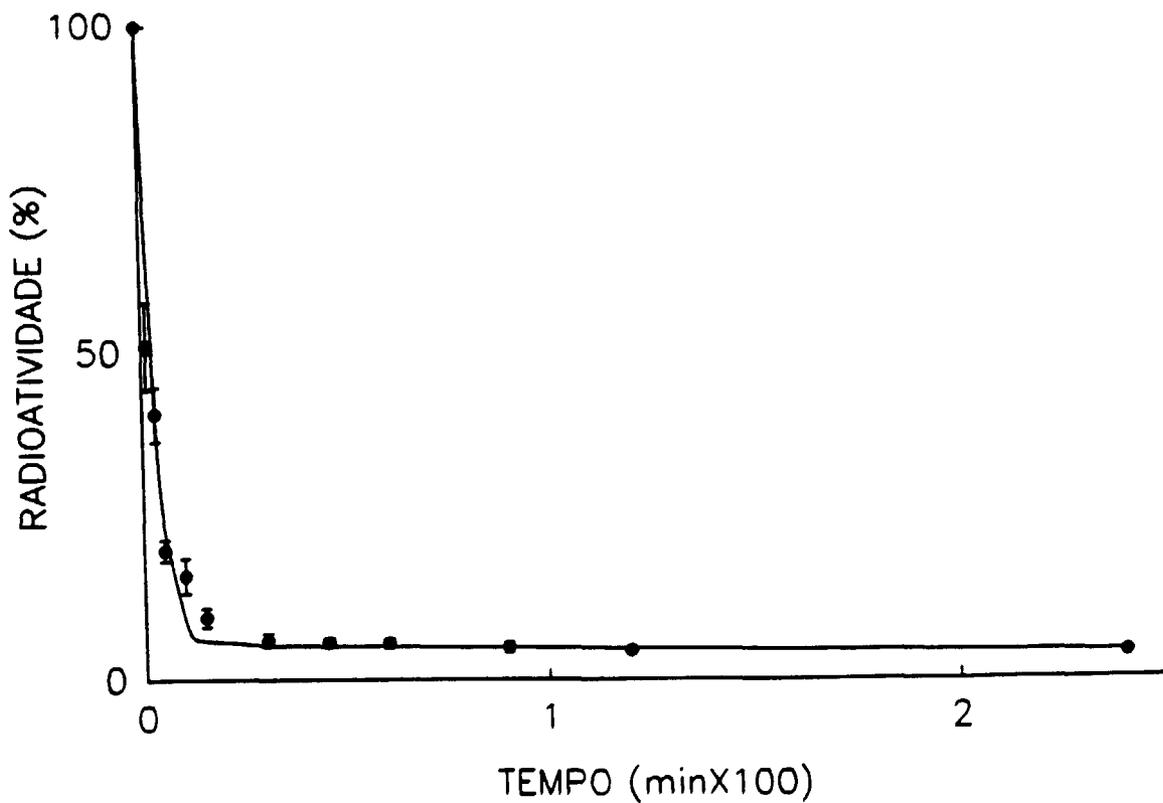


Figura 7- Curva de decaimento plasmático do ^{131}I -steviosídeo. Os pontos representam os dados observados experimentalmente. A linha contínua corresponde à curva obtida com os valores calculados pelo computador.

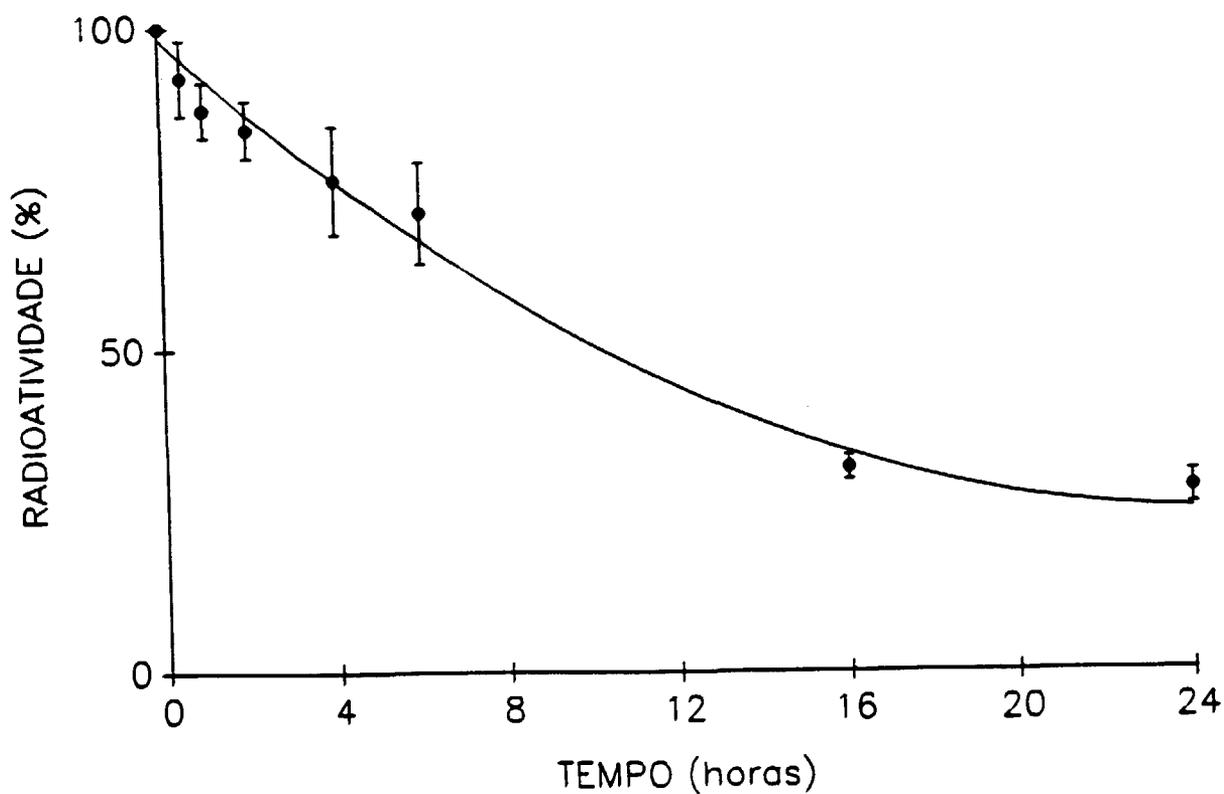


Figura 8- Curva de corpo inteiro. Os pontos representam os dados observados experimentalmente. A linha contínua corresponde à curva obtida pelo computador, através dos valores calculados.

TABELA IX

EXCREÇÕES URINÁRIA E FECAL
(% Dose)

Amostras	Tempo (horas)	Valor Observado	Valor Calculado
URINA	24	34,70	37,32
FEZES	24	35,30	37,35

Correlação entre os valores observados experimentalmente e aqueles obtidos através do Modelo Cinético Proposto.

V DISCUSSÃO

COMISSÃO NACIONAL DE

ENERGIA NUCLEAR/SN - 1970

Devido ao crescente emprego do steviosídeo como adoçante não calórico, propusemo-nos a investigar alguns aspectos relacionados com a distribuição e o metabolismo deste glicosídeo em ratos. Para tanto, foi necessário a obtenção do steviosídeo marcado com isótopo radioativo (^{131}I) para a viabilização dos estudos biológicos propostos.

Inicialmente, as amostras de steviosídeo e steviol foram submetidas a três métodos distintos para a determinação do grau de pureza. Os experimentos realizados com cromatografia em camada delgada revelaram a presença de mancha única tanto para o steviosídeo quanto para o steviol, sugerindo que as amostras analisadas encontravam-se puras. Os dados obtidos com a determinação do ponto de fusão também estavam de acordo com aqueles registrados na literatura para estes compostos³⁴. Entretanto, devido à necessidade de resultados mais precisos sobre o grau de pureza das substâncias, as amostras também foram submetidas à análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Estes experimentos demonstraram a existência de perfil único tanto para o steviosídeo quanto para o steviol, conforme descrito por ALVAREZ et al³. Com base nos resultados obtidos, concluímos que as amostras de steviosídeo e steviol encontravam-se puras.

Com a determinação do grau de pureza das substâncias, tiveram início os experimentos da marcação de steviosídeo e steviol com átomos de iodo, tendo como referência o trabalho desenvolvido por MATHOR et al²⁹.

De início, o steviosídeo foi marcado com iodo frio (^{127}I) para a realização do espectro infravermelho. Os resultados obtidos no espectro demonstraram a existência de alterações na região (1650 cm^{-1}) relativa às ligações duplas carbono=carbono. Foi também observado no espectro, o surgimento de banda a 590 cm^{-1} relativa ao estiramento da ligação carbono-iodo (C-I). De acordo com estes dados, pode-se concluir que houve realmente a incorporação de átomos de iodo na molécula do steviosídeo, e que esta incorporação provavelmente ocorreu entre os carbonos 16 e 17, como resultado da adição de iodo à ligação dupla existente entre estes átomos.

Uma vez constatada a incorporação de iodo à molécula do steviosídeo, passou-se a utilizar átomos de iodo radioativo (^{131}I) no processo de marcação. Como já foi mencionado anteriormente, as condições de marcação descritas por MATHOR et al²⁹ foram modificadas e padronizadas neste trabalho.

A necessidade de se obter um produto marcado em condições de ser injetado no animal, contribuiu para a introdução de modificações na técnica original de marcação. Dentre estas alterações, a que mais se destacou foi o volume de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) utilizado como agente oxidante durante o processo de marcação. O volume de H_2O_2 originalmente empregado era de 250 ul, o ^{131}I -steviosídeo obtido nestas condições foi injetado nos ratos e provocou morte instantânea nestes animais.

Após inúmeras investigações, ficou constatado que as

mortes foram causadas por edema agudo dos pulmões, resultante da ação do peróxido de hidrogênio. Para que o produto marcado pudesse ser obtido em condições de viabilizar os estudos biológicos, foi necessário reduzir o volume de H_2O_2 para apenas 50 ul, sem que houvesse prejuízo para o rendimento da marcação.

Com relação à massa do steviosídeo utilizada e o tempo de reação empregado no processo de marcação, os resultados demonstraram que a variação destes parâmetros não influenciaram de maneira significativa o rendimento de marcação. MATHOR et al²⁹ utilizaram uma massa de 20,0 mg de steviosídeo, enquanto que neste trabalho foi utilizado apenas 10,0 mg, sem qualquer comprometimento para o rendimento de marcação.

Com relação ao pH da solução, ficou demonstrado que à medida que o valor do pH ultrapassava a 2,0 registrava-se uma diminuição no rendimento de marcação, provavelmente devido a uma redução na concentração hidrogeniônica com conseqüente diminuição na formação de iodo.

O ^{131}I -steviosídeo permanecia estável por um período de 7 dias quando mantido em refrigerador a 4°C. Quando o mesmo produto foi mantido em temperatura ambiente por igual período, o percentual de iodo livre (^{131}I) aumentou significativamente quando comparado com o produto originalmente marcado ou com aquele mantido a 4°C. O aumento do percentual de iodo livre provavelmente se deve a uma redução da estabilidade da ligação carbono-iodo pelo aumento da temperatura. Assim, para cada semana uma nova marcação era realizada para a execução dos

experimentos.

Com um rendimento de marcação da ordem de 98%, o ^{131}I -steviosídeo foi injetado por via endovenosa em ratos machos. Durante os primeiros 30 minutos após a injeção foi observado uma queda acentuada nos níveis de radioatividade presente no plasma, demonstrando que o ^{131}I -steviosídeo transferiu-se rapidamente do compartimento sanguíneo para o espaço extravascular. Entretanto, não verificamos diferenças significativas entre os valores obtidos para os tempos de 30, 45, 60 e 90 minutos após a injeção do ^{131}I -steviosídeo, caracterizando-se como um período de estabilização dos níveis de radioatividade no plasma. O mais provável é que durante este intervalo tenha ocorrido um processo de absorção de compostos radioativos, capaz de assegurar níveis constantes de radiação.

Os resultados da distribuição do ^{131}I -steviosídeo nos tecidos mostraram que a mais alta concentração de radioatividade foi observada no fígado e no intestino delgado, 10 e 120 minutos após a injeção do produto marcado, respectivamente. Os resultados obtidos da eliminação biliar demonstram que a maior parte da radioatividade injetada passou pelo fígado e atingiu o intestino delgado através desse fluido. No intestino delgado, observou-se que a maior parcela da radioatividade estava presente no conteúdo intestinal, e que, parte foi absorvida pela parede do intestino, conforme mostrado na figura 4.

WINGARD et al⁴⁸ demonstraram que o ^{14}C -steviol quando

administrado por via oral em ratos foi completamente absorvido pelo intestino. Os resultados dos experimentos de cromatografia de alta eficiência (HPLC) da bile demonstraram que o steviol apareceu como o principal metabólito do steviosídeo, representando 47,3% de toda radioatividade presente na bile. Portanto, é possível que o steviol seja o principal componente da fração de radioatividade que foi absorvida pelo intestino.

Embora o steviol não tenha sido detectado na cromatografia (HPLC) da urina, sua excreção neste fluido não poderá ser descartada, já que o tempo de coleta da amostra examinada (90 min) possivelmente não foi suficiente para a detecção deste metabólito. Estudos anteriores demonstraram a eliminação de steviol na urina após a administração intracecal de ^{14}C -steviol em ratos⁴⁸.

O nível de radioatividade presente em tecidos como coração, pulmão, estômago, baço, testículos e músculos foi menor do que 1,80% da dose injetada durante todo o experimento, demonstrando uma inexpressiva captação da radiação para estes órgãos.

A tireóide apresentou captação baixa de radioatividade durante grande parte dos experimentos. Nos tempos de 240 e 1440 minutos a glândula apresentou um aumento nos níveis de captação. Entretanto, esta observação está de acordo com a literatura²¹ no que concerne a captação de iodeto para tempos tardios.

Nos rins, o mais alto nível de radioatividade foi

observado 3 minutos após a injeção do ^{131}I -steviosídeo. Como já foi mencionado, o produto injetado apresentava um teor de ^{131}I livre da ordem de 2%. Assim, é provável que parte desta captação renal seja devido ao ^{131}I livre, mesmo porque a excreção renal é a via preferencial de eliminação do iodo²¹. No entanto, a excreção por via renal de uma fração do ^{131}I -steviosídeo também não pode ser descartada, como aliás ficou demonstrado nos experimentos de HPLC de urina, figura 5.

Alguns pesquisadores⁴⁸ haviam demonstrado que o steviosídeo quando incubado "in vitro" com microflora intestinal de ratos foi totalmente degradado para steviol. Os resultados obtidos na cromatografia (HPLC) da bile revelaram a presença de uma parcela considerável de steviol, demonstrando que o organismo do rato possui mecanismos capazes de promover a degradação do steviosídeo para steviol. Como o steviol foi detectado na bile de ratos que apresentavam os ductos biliares canulados, não havendo assim nenhum contato deste fluido com o intestino, parece-nos claro que a metabolização do steviosídeo para steviol e outro metabólito ocorreu provavelmente no fígado. BRIDEL & LAVIEILLE⁹ já haviam demonstrado que o steviosídeo quando incubado com suco hepático do caramujo *Helix pomata* foi totalmente convertido para steviol através de hidrólise enzimática.

PEZZUTO et al³⁶ observaram que o steviol em concentrações relativamente baixas foi capaz de promover uma importante atividade mutagênica em experimentos realizados com *Salmonella*

typhimyrum.

Em nossos experimentos, ficou demonstrado que o organismo do rato foi capaz de degradar aproximadamente 50% de steviosídeo para steviol. Assim, e principalmente pelo fato do steviosídeo estar sendo amplamente utilizado como adoçante não calórico no Brasil e em outras partes do mundo, tornam-se necessários estudos adicionais sobre os efeitos tóxicos resultantes da ingestão contínua deste glicosídeo e de outros derivados da *Stevia rebaudiana*.

MODELO MATEMÁTICO DE DISTRIBUIÇÃO DO ¹³¹I-STEVIOSÍDEO

O modelo cinético do steviosídeo foi elaborado a partir dos dados obtidos da curva de decaimento plasmático, curva de corpo inteiro, excreções fecal e renal. A formulação do modelo baseou-se no possível comportamento fisiológico do steviosídeo.

Com o emprego do computador e de um programa específico (ANACOMP), foi possível trabalhar esses dados de modo a permitir a simulação de um modelo matemático que melhor representasse a distribuição do ¹³¹I-steviosídeo no organismo do rato.

Desta forma, o modelo cinético proposto para o ¹³¹I-steviosídeo ficou constituído por três compartimentos. O compartimento 1, também denominado de intra-vascular ou central, do qual a substância injetada é transferida através das membranas biológicas para o compartimento extra-vascular

(2). No modelo, a tireóide está representada como um local de retenção de radioatividade, denominado de compartimento 3.

A constante K_{12} representa a fração de conteúdo presente no compartimento 1 que se transfere para o compartimento 2 por unidade de tempo. Por outro lado, a constante K_{21} representa a fração de conteúdo do compartimento 2 que retorna ao compartimento 1 por hora. Pelo valor de K_{12} , pode-se deduzir que o ^{131}I -steviosídeo transfere-se rapidamente do compartimento vascular para o extra-vascular, o que aliás, ficou demonstrado pelos dados obtidos na curva experimental de decaimento plasmático. Estes dados revelam que após 30 minutos da injeção do ^{131}I -steviosídeo, apenas 6,12% da dose injetada encontrava-se no plasma, sendo que aproximadamente 94,0% já se encontrava nos tecidos.

Pelo simples fato do estabelecimento da constante K_{21} fica evidente que o modelo cinético pressupõe um retorno da radioatividade do espaço extra-vascular para o meio intra-vascular.

Com relação ao intercâmbio de frações de radioatividade entre os compartimentos 1 e 3 foi observado somente a presença da constante K_{13} , sugerindo que não houve retorno de radioatividade da tireóide para o compartimento vascular. Provavelmente, o período investigado (24 horas) não tenha sido suficiente para que o iodo captado pela tireóide retornasse à circulação.

O modelo cinético proposto estabeleceu duas vias de

eliminação para a radioatividade. A via fecal, representada pela constante K_{20} e a via urinária caracterizada pela constante K_{10} . Experimentalmente, ficou demonstrado que a radioatividade foi eliminada tanto pelas fezes quanto pela urina.

Com relação à meia-vida biológica pertinente a cada compartimento, observou-se que o menor valor para $t_{1/2}$ foi correspondente ao compartimento 1, o que demonstra matematicamente que em um intervalo de tempo relativamente curto (2,4 minutos), metade do conteúdo presente no meio intra-vascular transferiu-se para o meio extra-vascular.

Por outro lado, o maior valor de $t_{1/2}$ foi correspondente à constante K_{20} , representando o tempo gasto para que a metade do conteúdo presente no meio extra-vascular fosse eliminado por via fecal. A grandeza deste valor reflete muito bem o processo fisiológico envolvido na eliminação da substância por esta via, pois implica na passagem do ^{131}I -steviosídeo e seus metabólitos por toda a extensão do trato intestinal.

Assim, a compartimentalização proposta e os valores obtidos com a simulação do modelo parecem ilustrar bem a distribuição do ^{131}I -steviosídeo, adequando-se aos valores obtidos experimentalmente. Desta forma, o modelo cinético contribui para uma melhor compreensão dos fenômenos decorrentes da distribuição de um fármaco, ou de um traçador em um organismo vivo.

VI CONCLUSÕES

1. A maior captação de radioatividade foi observada no fígado e no intestino delgado, 10 e 120 minutos após a administração, respectivamente;
2. O steviosídeo foi parcialmente degradado "in vivo" para steviol e outro metabólito não identificado;
3. O steviol apareceu como o principal metabólito na bile, representando 47,3% da radioatividade presente neste fluido;
4. Os resultados sugerem que a degradação do steviosídeo para steviol e outro metabólito ocorreu no fígado;
5. Houve absorção de compostos radioativos pelas paredes do intestino delgado;
6. A compartimentalização proposta e os valores obtidos com a simulação do modelo ajustaram-se perfeitamente com os dados observados experimentalmente;
7. Necessidade de estudos adicionais sobre os efeitos tóxicos crônicos provenientes do uso de steviosídeo, princípio doce presente nas folhas da *Stevia rebaudiana*.

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SF - IPEN

1. AHMED, S.M.; DOBBERSTEIN, H.R. III High-performance liquid chromatographie-separation and quantitation of rebaudioside B, D and E, dulcoside A, and steviolbioside. *J. of Chrom.*, 245: 373-376, 1982.
2. AKASHI, H. & YOKOYAMA, Y. Dried-leaf extracts of Stevia Toxicological Test. *Shokuhin Kogyo.*, 18(20): 34-43, 1975.
3. ALVAREZ, M.; KUSUMOTO, T.I. Quantitatives analysis of glycosidic sweeteners from Stevia rebaudiana and its hydrolysis products by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Arq. Biol. Tecnol.*, 30(2): 337-348, 1987.
4. ANGELUCCI, E. O esteviosídeo de plantas brasileiras da Stevia Rebaudiana Bert e a potencialidade de seu emprego em alimentos. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP. 1979 (Tese de Doutorado).
5. ATALLAH, M.R.; GLENN, H.J. Animal handling, drug administration, dissection and tissue and fluid sampling techniques. In: GLENN, H.J. *Biologic applications of radiotracers*. Boca Raton, Fl., CRC, 1982. Cap. 6, p.129-149.

6. BERTONI. M.S. Le Kaá-hê-é. Sa nature et ses propriétés. An. Ci. Paraguayos.. 1: 1-14, 1905.
7. BORTOLETI, A.E. Estudo da biodistribuição e características biológicas do ácido p-[bis-carboximetil aminometil carboxiamino] hippúrico (PAHIDA) marcado com tecnécio-99m. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. USP, 1990 (Tese de Mestrado).
8. BRAY, G.A. Obesity. In: Present knowledge in Nutrition. Washington, Nutr. Foundation, 1990, p. 23-28.
9. BRIDEL, M.; LAVIEILLE, R. Le principe à saveur sucrée du kaá-hê-é (*Stevia rebaudiana* Bert). Bull. Soc. Chim. Biol., 13: 636, 655, 1931.
10. CABREJAS, M.L. Utilización de la computadora em estudios dinámicos com radioisótopos en medicina: aplicación del análisis compartimental. Rev. Biol. Med. Nucl., 6: 68-74, 1974.
11. CÁRCAMO, E.C. Introduction a la farmacocinética. Washington, D.C., Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, 1982.

12. CERNIGLIA, E.C.; FREEMAN, P.J.; MITCHUM, K.R. Glucuronide and sulfate conjugation in the fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. *Appl. Envir. Microb.*, 43(5): 1070-1075, 1982.
13. EKMAN, G. & AKESSON, C. Saltness, sweetness and preference. *Scand. J. Psych.*, 6: 241-253, 1965.
14. FARNSWORTH, N.R. Current status of sugar substitutes. *Cosmetics & Perf.*, 88: 27-35, 1973.
15. FELIPPE, G.M. *Stevia rebaudiana* Bert: uma revisão. *Cienc. Cult.*, 29(11): 1240-1248, 1977.
16. FLETCHER, G.H. The sweet herb of Paraguay. *Chemurgic Digest.*, 14: 7 e 18, 1955.
17. FLORES, Z.R.; CECHIN, Z.T.S.; SILVA, R.C.A. Ausência de mutagênese induzida pelo steviosídeo da *Stevia rebaudiana* (Bert). *Bertoni. Cienc. Cult.*, 39(4): 417-418, 1987.
18. FUJITA, H.; EDAHIRO, T. *Shokuhin Kogyo*, 22(20): 66-72, 1979 apud: PEZZUTO et al. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 82: 2478-2482, 1985.

19. GANONG, W.F. *Fisiologia Médica*. 2 ed. São Paulo, SP, Atheneu. 1973, p. 557-581.
20. GHOSH, A. & SLOVITER, H.A. Glycolysis and the Pasteur effect in rat reticulocytes. *J. Biol. Chem.*, 248: 3035-3040, 1973.
21. HALMI, N.S. & PITT-RIVERS. The iodide pools of the rat thyroid. *Endocrinology*. 70: 660-668. 1962.
22. ISHII, L.E.; SCHWAB, J.A.; BRACHT, A. Inhibition of monosaccharide transport in the intact rat liver by stevioside. *Biochem. Pharmac.*, 36(9): 1417-1433, 1987.
23. KELMER BRACHT, A.M.; ALVAREZ, M.; BRACHT, A. Effect of stevioside and its derivatives on rat liver mitochondria. *J. Med. Biol. Res.*, 16(5-6): 521, 1983.
24. KELMER BRACHT, A. M.; ALVAREZ, M.; BRACHT, A. Effects of *Stevia rebaudiana* natural products on rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmac.*, 34(6): 873-882, 1985.
25. KOBERT, R. Concerning two sweet-tasting drugs. *Amer. Pharm.*, 87: 555-559, 1915.

26. LEE, H.B.; BLAUFOX, M.D. Blood volume in rat. *J. Nucl. Med.*, 25: 72-76, 1985.
27. LEE, J.; KIM, K.R.; PARK, J.R.; KIM, K.S. TCHAI, B.S. A study on the safety of stevioside as a new sweetening source. *Hanguk Sikpum Kwahahoe Chi*, 11: 224-231, 1978.
28. LUCAS, S.M.; LAJOLO, F.M.; BARBÉRIO, J.C. Gaiola metabólica para ratos testados por meio de zinco radioativo ^{65}Zn . *Rev. Fac. Farm. Bioquímica*, 7(2): 353-359, 1969.
29. MATHOR, M.; ALMEIDA, M.A.; HAMADA, E. Labelling of *Stevia rebaudiana* glycosides with ^{131}I . *New Persp. in Nucl. Med.*, Part 2, Gordon Breade, Science Publishers, NY, p. 77, 1989.
30. MESQUITA, C.H. Modelo para determinação da absorção de substâncias radioativas - Aplicação em radiodosimetria e nutrição. São Paulo, IPEN/CNEN-USP, 1991. (Tese de Doutorado).
31. METIVIER, J.; VIANA, A.M. Determination of microgram quantities of stevioside from leaves of *Stevia rebaudiana* Bert by two dimensional thin layer chromatography. *J. Exper. Botan.*, 30(117): 805-810, 1979.

32. MIZUTANI, K.; MIYATA, T.; KASAI, R.; TANAKA, O.; SUSUMU, O.; DOI, S. Study on improvement of sweetness of steviol Bisclycosides: selective enzymic transglucosylation of the 13-O-Glycosil Moiety. *Agric. Biol. Chem.*, 53 (2): 395-398, 1989.
33. MORITA, T.; ASSUMPCÃO, R. *Manual de soluções, reagentes e solvents*. E. Blücher. 1972, p. 150, São Paulo.
34. MOSETTIG, E.; BEGLINGER, U.; DOLDER, F.; LICHTI, H.; QUITT, P.; WATERS, J.A. The absolute configuration of steviol and isosteviol. *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2305-2309, 1963.
35. OVIEDO, C.A.; FRONCIANI, G.; MORENO, R.; MÁAS, L.C. Accion hipoglucemiante de la Stevia rebaudiana Bertoni (Caá-Jheê). *Excerpta méd.*, 92-93, 1971.
36. PEZZUTO, M.J.; COMPADRE, M.C.; SWANSON, M.S.; DHAMMIKA, N.P.; KINGHORN, D.A. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 82: 2478-2482, 1985.

37. PEZZUTO, M.J.; DHAMMIKA, N.P.; COMPADRE, M.C.; SWANSON, M.S.; KINGHORN, D.A.; GUENTHNER, M.T.; SPARNINS, L.V.; LAM, K.T.L. Characterization of bacterial mutagenicity mediated by 13-hydroxy-ent-kaurenoic acid (steviol) and several structurally related derivatives and evaluation of potencial to induce glutathione s-transferase in mice. *Mutat. Res.*, 169: 93-103, 1986.
38. PLANAS, G.M. & KUÉ, J. Contraceptive properties of *Stevia rebaudiana*. *Science*, 162: 1007, 1968.
39. POMARET, M.; LAVIEILLE, R. Quelques propriétés physiologiques du stevioside. *Bull. Soc. chim. biol.*, 13: 1248-1252, 1931.
40. PORTELLA, N.B.A.; PEREIRA, N.A. Efeito da Caá-heê (*Stevia rebaudiana*) (Bertoni) sobre a fertilidade de animais experimentais. *Rev. Bras. Farm.*, 69: 47-50, 1988.
41. RAYUDU, G.V.S.; COLOMBETTI, L.G. ed. *Radiotracers for medical applications*. Boca Raton. CRC Press, 1983. v.2.
42. SAKAGUCHI, M.; TATSUHIKO, K. As pesquisas japonesas com *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni e o esteviosídeo. *Cienc. Cult.*, 34(2): 235-248, 1982.

43. SARDESAI, M.V. & WALDSHAN, T.H. Natural and synthetic intense sweeteners. *J. Nutr. Biochem.*, 2: 236-244, 1991.
44. STEINER, J.E. Innate, discriminative human facial expressions to taste and smell stimulation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 237: 228-233, 1974.
45. TAUXE, W.N.; DUBOVSKY, E.V.; KIDD, J.R.T.; SMITH, L.R.; LEWIS, R.; RIVERA, R. Prediction of urinary excretion of ¹³¹I-orthoiodo hippurate. *Eur. J. Nucl. Med.*, 7: 102-103, 1982.
46. TSUSCHIYA, S. N. *Food Ind.*, 21(9): 12-15, 1979 apud PEZZUTO et al. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 82: 2478-2482, 1985.
47. VON SCHMELLING, G.A.; CARVALHO, V.F.; ESPINOSA, D.A. Avaliação do efeito hipoglicemiante em coelhos aloxanizados. *Cienc. Cult.*, 29(5): 599-601, 1977.
48. WINGARD, R.E.; BROWN, J.P.Jr.; ENDERLIN, F.E.; DALE, J.A.; HALE, R.L.; SEITZ, C.T. Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Experientia*, 36: 519-520, 1980.

49. WOOD, B.H.; ALLERTON, R.; DIEHL, W.H.; FLETCHER, G.H. Stevioside. I. The structure of the glucose moieties. *J. Org. Chem.*, 20: 875-883, 1955.
50. WORTHINGTON-ROBERTS, B.S. Carbohydrates in health and disease. In: *Contemporary Developments in Nutrition*, Mosby, St Louis, B.S. Worthington-Roberts, 1981, p. 1-43.
51. YAMADA, A.; OHGAKI, S.; NODA, T.; SHIMIZU, M. Chronic toxicity study of dietary stevia extracts in F344 rats. *J. Food. Hyg. Soc. Japan.*, 26(2): 169-183, 1985.
52. YAMAMOTO, N.S.; BRACHT, K.A.M.; ISHII, E.L.; KEMMELMEIER, F.S.; ALVAREZ, M.; BRACHT, A. Effect of steviol and its structural analogues on glucose production and oxygen uptake in rat renal tubules. *Experientia.*, 41: 55-57, 1985.



120140

Ciência Universitária - "ARMANDO DE SALLES OLIVEIRA"
Travessa R nº 400 - Caixa Postal 11049 - Piracicaba
Telefone (PABX) 211-6011 - End. Telegráfico IPENUCLEAR
Telex (11) 00001 - IPEN-BR
São Paulo - Brasil

