

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

JOAMYR VICTOR ROSSONI JÚNIOR

**PERFIL LIPÍDICO, DEFESAS ANTIOXIDANTES E
MARCADORES DE FUNÇÃO HEPÁTICA E RENAL EM
HAMSTERES TRATADOS COM EXTRATOS DE
SEMENTES DE URUCUM**

**Ouro Preto
2008**

JOAMYR VICTOR ROSSONI JÚNIOR

**PERFIL LIPÍDICO, DEFESAS ANTIOXIDANTES E
MARCADORES DE FUNÇÃO HEPÁTICA E RENAL EM
HAMSTERES TRATADOS COM EXTRATOS DE
SEMENTES DE URUCUM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica

Orientador: Prof. Dr^o Marcelo Eustáquio Silva

Co-orientador: Prof. Dr^a Maria Lúcia Pedrosa

Ouro Preto
2008

R838p Rossoni Júnior, Joamyr Victor.

Perfil lipídico, defesas antioxidantes e marcadores de função hepática e renal em hamsteres tratados com extratos de sementes de urucum [manuscrito] / Joamyr Victor Rossoni Júnior. – 2008.
xvi, 97 f.: il., color.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva.
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Maria Lúcia Pedrosa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica estrutural e fisiológica.

1. Colesterol - Teses. 2. Antioxidantes - Defesas - Teses. 3. Fígado - Teses.
4. Rins - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 6162.397

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

*“Sobre Tudo O Que Se Deve Guardar,
Guarda O Teu Coração, Porque
Dele Procedem As Fontes
Da Vida.”*

Pv 4:23

Este Trabalho É Dedicado...

***... AOS MEUS PAIS, ANASIR E JOAMYR,
E AO MEU IRMÃO HYGOR
COM MUITO AMOR...***

AGRADECIMENTOS

A todos do Laboratório de Nutrição Experimental pelo convívio maravilhoso, pela dedicação e ajuda – Maísa, Fabrício, Bruno, Herberth, Lorena, Melina, Larissa, Fabiano, Wanda, Marquinhos, Aleçandra, Emerson, Alan, Laura, Kamilla, Jamilly, Flávia e ao técnico Jair.

Ao Fabrício e Bruno, pelo exemplo de pessoa e por toda ajuda a mim dispensada;

Ao professor Jorge Humberto e a Geisla que foram de grande ajuda na purificação da bixina;

A Roberta e Lorena que me acompanharam desde a graduação e são pessoas super especiais – OBRIGADO PELA FORÇA, AJUDA E CONSELHOS;

Aos colegas da pós-graduação e a duas pessoas que conheci nessa fase e que se tornaram muito especiais, Fabiana e Carlito – MUITO OBRIGADO;

A Maria Aparecida, “Cida”, que pelo seu bom humor contagia a todos e consegue nos ajudar em tudo que precisamos – MUITO OBRIGADO;

A todos da Escola de Nutrição e do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas que apenas com o seu “oi” de cada dia, nos ajudam muito;

Aos meus 64 hamsteres.....

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus orientadores Prof. Drº Marcelo Eustáquio Silva e Prof. Drª Maria Lúcia Pedrosa, pela competência como pesquisadores. Agradeço a oportunidade oferecida para que eu pudesse realizar este trabalho e pela confiança em mim depositada.

MEU MUITO OBRIGADO

AGRADECIMENTO PESSOAL

A Deus pelo dom da vida e pela dádiva do saber, a quem nos momentos difíceis recorri e sempre me iluminou – OBRIGADO SENHOR;

Aos meus pais, por abrirem mão de alguns sonhos para que os meus fossem realizados – AMO MUITO VOCÊS e sei que jamais poderei retribuir a altura o que vocês fizeram por mim;

Ao meu irmão – apesar da distância sei que você estava/está sempre presente onde eu estou, e eu sempre estava/estou presente onde você está;

Aos amigos-irmãos Cássio, Filipe, Warley, Thiago, Wilian, Marcus, Alessandro, Lucas vocês foram fundamentais em todos os momentos vividos aqui em Ouro Preto e na minha vida;

Aos meus amigos da melhor turma de Ciências Biológicas que esta Universidade teve – Roberta, Jane, Lorena, Geisla, Neliane, Luis, São Pedro;

A todos os amigos que fiz nessa cidade (todos sabem de quem estou falando); vocês são e foram imprescindíveis para minha sobrevivência nesses 6 anos;

A uma pessoa muito especial que infelizmente não está mais entre nós – Lineu – você me ensinou a gostar de pessoas totalmente diferentes de mim, com seu jeito todo extrovertido, brincalhão, criança conquistou minha amizade. Te amo Takinha, você é especial;

“A amizade pode existir entre as pessoas mais desiguais. Ela os torna iguais”
(Aristóteles)

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	2
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 - URUCUM (<i>BIXA ORELLANA</i> L.).....	5
2.1.1 – PIGMENTOS DO URUCUM.....	8
2.1.2 – IMPORTÂNCIA DOS CAROTENÓIDES NA DIETA.....	13
2.1.3 – ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	14
2.2 - METABOLISMO DE COLESTEROL, LIPOPROTEÍNAS E SUA RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DA ATEROSCLEROSE.....	18
2.3 - DISLIPIDEMIAS.....	22
2.4 - ATEROSCLEROSE.....	24
2.6 – MODELOS ANIMAIS NA PESQUISA DA ATEROSCLEROSE E SUA PREVENÇÃO.....	26
CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS.....	30
3.1 – OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
CAPÍTULO 4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 - ANIMAIS.....	32
4.2 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	32
4.3 - DIETAS.....	33
4.4 - DOSAGENS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	34
4.4.1 - DOSAGEM DO COLESTEROL TOTAL.....	35
4.4.3 - DOSAGEM DO COLESTEROL HDL.....	36
4.4.4 - DETERMINAÇÕES DOS NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL NÃO HDL.....	37
4.4.5 - DOSAGEM DE TRIACILGLICERÓIS.....	37

4.4.6 - DOSAGEM DE GLICOSE	38
4.4.7 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS	39
4.4.8 - DOSAGEM DE ALBUMINA	40
4.4.9 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA (ALP).....	40
4.4.10 - DOSAGEM DE URÉIA.....	41
4.4.11 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)....	42
4.4.12 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT).....	44
4.4.13 - DOSAGEM DE SULFIDRILAS TOTAIS, LIVRES E LIGADAS À PROTEÍNAS.....	45
4.4.14 - DOSAGEM DE HEMOGLOBINA.....	46
4.4.15 - DOSAGEM DE PARAOXONASE (PON) – ATIVIDADE ARILESTERASE	47
4.4.16 - DOSAGEM DE CREATININA	48
4.4.17 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA CATALASE	49
4.4.18 - DOSAGEM DE GORDURA NO FÍGADO	49
4.4.20 - DOSAGEM DE GORDURA NAS FEZES	50
4.4.21 – DOSAGEM DE COLESTEROL TOTAL NA GORDURA DO FÍGADO.....	50
4.4.22 – DOSAGEM DE TRIACILGLICERÓIS NA GORDURA DO FÍGADO.....	50
4.4.23 - AVALIAÇÃO NUTRICIONAL.....	51
4.4.24 - PESO DO FÍGADO, BAÇO E CORAÇÃO	51
4.4.25 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
CAPÍTULO 5 - RESULTADOS	53
CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	64
2.1 – METABOLISMO LIPÍDICO.....	64
2.2 – FUNÇÃO HEPÁTICA	71
2.3 – FUNÇÃO RENAL	73
2.4 – DEFESAS ANTIOXIDANTES	75
2.5 – OUTROS METABÓLITOS	80
CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:.....	86

LISTA DE SIGLAS

- ALT – Alanina aminotransferase
- ALP – Fosfatase alcalina
- AST – Aspartato aminotransferase
- Apo – Apolipoproteína
- C – Grupo de hamsteres alimentados com dieta padrão
- CB15 – Dieta padrão contendo 0,015% de torta de bixina.
- CB75 – Dieta padrão contendo 0,075% de torta de bixina
- Ch – Dieta padrão mais infusão aquosa de urucum
- CETP – Proteína de transferência de éster de colesterol
- CT – Colesterol total
- CYP-7 α – Colesterol 7 α -hidroxilase
- DAC – Doença aterosclerótica coronariana
- DCV – Doenças cardiovasculares
- DTNB – 5,5-ditio-bis-2-nitro-benzóico
- EROS – Espécies reativas de oxigênio
- ERN – Espécies reativas de nitrogênio
- ESPAS – N-etil N-sulfopropil n-anizidine
- GOD – Glicose oxidase
- GSH – Glutathiona reduzida
- H – Grupo de animais alimentados com dieta hipercolesterolemiantes
- Hb – Hemoglobina
- HB15 – Dieta hipercolesterolemiantes contendo 0,015% de torta de bixina.
- HB75 – Dieta hipercolesterolemiantes contendo 0,075% de torta de bixina.
- HCh – Dieta hipercolesterolemiantes mais infusão aquosa de urucum
- HDL – Lipoproteínas de alta densidade
- HDL– C – colesterol em lipoproteína de alta densidade
- Hi – Hemoglobina
- HiCN – Cianeto de hemoglobina

HMG – CoA – 3-Hidróxi-3-metil-glutaril Coenzima A
IDL – Lipoproteínas de densidade intermediária
IMC – Índice de massa corporal
LCAT – Lecitina colesterol acil transferase
Lp (a) – Lipoproteína (a)
LDL – C – Colesterol em lipoproteína de baixa densidade
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LDL-R – Receptores de lipoproteína de baixa densidade
M-CSF – Fator estimulante de colônias de macrófagos
MPC-1 – Proteína quimiotática para monócitos
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
QM – Quilomícrons
TG – Triacilgliceróis
t-PA – ativador do plasminogênio tecidual
VLDL – Lipoproteínas de muito baixa densidade
VLDL– C – Colesterol em Lipoproteínas de muito baixa densidade
PCR-as – Proteína C reativa de alta sensibilidade
PON – Paraoxonase
SOD – Superóxido dismutase
TCA – Ácido Tricloroacético

LISTA DE TABELAS

TABELA I – Algumas espécies reativas de oxigênio, juntamente com sua meia-vida, em segundos.....	15
TABELA II – Principais classes e características das lipoproteínas plasmáticas.....	20
TABELA III – Valores de referência dos Lipídeos Plasmáticos adotados no Brasil segundo as III Diretrizes Brasileiras de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose.	23
TABELA IV – Composição das dietas padrão e hipercolesterolêmicas em gramas para cada 1000g de dieta.....	33
TABELA V – Níveis séricos de colesterol total (CT), colesterol HDL, triacilgliceróis (TG) e colesterol não HDL de animais alimentados com dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75).	54
TABELA VI – Gordura total, colesterol total e triacilgliceróis no fígado de animais alimentados com uma dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75).	55
TABELA VII – Gordura total, colesterol total e triacilgliceróis nas fezes de animais alimentados com uma dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75).	56
TABELA VIII – Peso do fígado, atividade da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) séricos de animais alimentados com dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75).....	57

TABELA IX – Peso dos rins, uréia e creatinina séricos peso dos rins de animais alimentados com uma dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75). 58

TABELA X – Sulfidrilas totais (SH tt), sulfidrilas livres (Sh livre) e sulfidrilas ligadas a proteínas (Sh prot) séricos de animais alimentados com uma dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75). 59

TABELA XI – Atividade da catalase e paraoxonase (PON) séricos de animais alimentados com uma dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75). 60

TABELA XII – Glicose, proteínas totais e albumina séricos de animais alimentados com uma dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75). 61

TABELA XIII – Hemoglobina (Hb) séricos e peso do baço e coração de animais alimentados com uma dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75). 62

TABELA XIV – Valores do peso inicial e peso final de animais alimentados com uma dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75). 62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fotos de urucum.....	6
FIGURA 2 – Rota proposta da biosíntese da bixina a partir do licopeno.	9
FIGURA 3 – Estrutura dos carotenóides <i>cis</i> e <i>trans</i> bixina e norbixina.....	11

RESUMO

O urucum (*Bixa orellana* L.) tem sido descrito pela comunidade científica por seu efeito hipocolesterolemiantes. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da infusão aquosa do urucum (*Bixa orellana* L) e da torta de bixina sobre o perfil lipídico, defesas antioxidantes e marcadores de função hepática e renal em hamsteres.

Foram utilizados 64 hamsteres machos *Golden Syrian* que foram distribuídos em oito grupos: controle (C) recebeu dieta padrão (AIN-93 M), H recebeu dieta hipercolesterolemiantes, CCh recebeu dieta padrão e infusão aquosa de urucum, HCh recebeu dieta hipercolesterolemiantes e infusão aquosa de urucum, CB15 recebeu dieta padrão contendo 0,015% de torta de bixina, HB15 recebeu dieta hipercolesterolemiantes contendo 0,015% de torta de bixina, CB75 recebeu dieta padrão contendo 0,075% de torta de bixina e HB75 recebeu dieta hipercolesterolemiantes contendo 0,075% de torta de bixina. Amostras de sangue foram coletadas após oito semanas de experimento para realização das dosagens bioquímicas. Nos grupos hipercolesterolemiantes tratados com bixina, mas não nos que receberam dieta padrão tratados com bixina observamos um aumento dos níveis séricos de colesterol total, colesterol não-HDL, da fração HDL do colesterol, do colesterol hepático e da porcentagem de gordura nas fezes. Observamos uma diminuição dos triacilgliceróis nos grupos CB15, CB75 e HB75. A atividade da aspartato aminotransferase foi diminuída nos grupos que receberam dieta hipercolesterolemiantes contendo 0,015% e 0,075% de torta de bixina. O tratamento com a torta de bixina aumentou a atividade da ALP nos grupos CB15, HB15 e HB75 e na concentração de creatinina nos grupos CCh, CB15, CB75 e HB75. A atividade da paraoxonase apresentou-se diminuída nos grupos CCh, CB15 e CB75. A concentração de sulfidrilas ligadas a fração protéica aumentou 50% nos grupos CB15 e CB75 e uma diminuição de 30% nos grupos HB15 e HB75. A atividade da catalase aumentou nos grupos CB15 e HB15 e a atividade da paraoxonase apresentou-se diminuída nos grupos CCh, CB15 e CB75. Nossos dados indicam que no modelo experimental proposto e na concentração utilizada de torta de bixina houve um aumento na concentração sérica do colesterol nos grupos hipercolesterolemiantes não corroborando, dessa forma com os dados encontrados na literatura. Não observamos efeito protetor hepático e renal da torta de bixina nos hamsteres.

ABSTRACT

Annatto seeds (*Bixa orellana* L.) are known to the scientific community for their hypocholesterolemic effects. This study aimed to evaluate the aqueous infusion effect of the annatto (*Bixa orellana* L.) and bixin cake about on the lipid profile, antioxidant defenses and markers of the hepatic and renal function in hamsters.

Eight groups were formed containing eight male *Golden Syrian* hamsters each. The group control (C) received the standard (AIN-93 M) diet, H received a hypercholesterolemic diet, CCh received standard diet and aqueous annatto infusion, HCh received hypercholesterolemic diet and aqueous annatto infusion, CB15 received standard diet containing 0,015% of bixin cake, HB15 received hypercholesterolemic diet containing 0,015% of bixin cake, the group CB75 received a standard diet containing 0,075% of bixin cake and the group HB75 received a hypercholesterolemic diet with 0,075% of bixin cake. Samples of blood were collected after eight weeks of experiment so that the biochemical dosages were made.

In the groups hypercholesterolemic treated with bixin, that don't received standard diet treated with bixin cake, we observed an increase of the serum levels of cholesterol, non-HDL cholesterol, HDL cholesterol, liver cholesterol and the fat percentage in the feces. In groups CB15, CB75 and HB75 diminished levels of triacylglycerols were found. Aspartate aminotransferase activity was decreased amongst the animals receiving the hypercholesterolemic diet containing both levels of bixin cake. The treatment with this product increased the activity of alkaline phosphatase in groups CB15, HB15 and HB75 as compared to groups C and H and in the creatinine concentration in the groups CCh, CB15, CB75 and HB75. Sulphydryl concentration in serum proteins increased 50% in CB15 and CB 75 in relation to the controls but decreased 30% in groups HB15 and HB75 in relation to H. Catalase activity increased in groups CB15 and HB15. Paraoxonase activity was found to be lower in the CCh, CB15 and CB75 animals as compared to the controls. Our data indicate that in the experimental model proposed and in the utilized level of bixin cake there was an increase in the concentration of serum cholesterol in the hypercholesterolemic groups and this does not corroborate with results found in the literature. We didn't observe hepatic and renal protecting effect of the bixin cake in the hamsters.

INTRODUÇÃO



CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Segundo Joly (1993), o urucum (*Bixa orellana* L.) é o único gênero pertencente à família Bixaceae, uma árvore nativa das florestas chuvosas da América Tropical e extremamente cultivado. É o *urucu* para os índios, *annatto* para os ingleses e *achiote* ou *bija* para os espanhóis. Neste trabalho a planta será referida como urucuzeiro e a semente por urucum.

O urucum é a mais importante fonte de corantes naturais utilizados mundialmente. Características raras, como a obtenção de extratos hidrossolúveis ou lipossolúveis a partir de uma mesma matéria-prima e a estabilidade conferida por sua propriedade de se ligar a determinadas proteínas, faz do urucum um dos principais corantes naturais para alimentos utilizados em todo o mundo. O consumo mundial de corantes naturais está em torno de 70% e no Brasil em torno de 90% (CONTO *et al.*, 1991).

A torta de bixina utilizada neste trabalho é o pigmento extraído do pericarpo da semente do urucum, constituído de vários carotenóides e que posteriormente é prensado e a infusão aquosa foi feita a partir de seis gramas de semente de urucum seca para cada litro de água.

O principal pigmento encontrado no urucum é a bixina de coloração vermelho-amarelada que representa cerca de 80% de todos os carotenóides presentes na semente. A bixina é solúvel em óleo e é o único carotenóide natural que possui dois grupos carboxílicos (MERCADANTE *et al.*, 1997) sendo o mais efetivo supressor biológico do radical oxigênio simpleto podendo contribuir para a proteção de células e tecidos contra os efeitos deletérios dos radicais livres e possuir efeito hipocolesterolemiantes (DI MASCIO *et al.*, 1990).

Estudos toxicológicos recentes demonstraram que a norbixina, e em última instância a bixina, uma vez que esta é desmetilada *in vivo*, é destituída de efeitos deletérios significativos sobre células hepáticas, renais e da medula óssea de camundongos e ratos (LIMA, 2003; FERNANDES, 1999). Embora nenhum efeito embriotóxico tenha sido demonstrado em ratos (PAUMGARTTEN, 2002), um grau

considerável de interferência com o controle metabólico da glicose nestes roedores foi percebido (FERNANDES, 1999) e há relatos de uso popular da planta para tratamento do *Diabetes mellitus* (PAUMGARTTEN, 2002).

O reconhecimento da hipercolesterolemia e estresse oxidativo como fator de risco para doenças ateroscleróticas levou a uma busca de alimentos que fossem eficazes na redução dos níveis de colesterol e de radicais livres. Também é muito comum - principalmente após o reconhecimento da fitoterapia como terapia funcional - a ingestão de chás para obtenção de tais resultados.

Recentemente, o interesse em se encontrar compostos antioxidantes naturais para uso em insumos alimentares e medicinais tem aumentado consideravelmente, substituindo os antioxidantes sintéticos, os quais têm seu uso restrito por seus efeitos carcinogênicos (ZHENG e WANG, 2001; ITO *et al.*, 1983). Os antioxidantes naturais podem proteger o corpo humano dos radicais livres e retardar o progresso de muitas doenças crônicas tornando mais lenta a oxidação de lipídios (LAI *et al.*, 2001; KINSELLA *et al.*, 1993; PRYOR, 1991).

A cultura popular considera que o urucum tem a capacidade de diminuir a concentração de colesterol plasmático e como a hipercolesterolemia é um fator de risco para as doenças cardiovasculares, decidiu-se estudar a relação entre as disfunções do metabolismo do colesterol em hamsteres, pois, os mesmos são propostos como animais modelo para estudo do metabolismo lipídico, visto que em nosso laboratório resultados preliminares encontrados em ratos indicaram um possível efeito hipocolesterolemizante da infusão aquosa do urucum e da torta de bixina.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - URUCUM (*BIXA ORELLANA* L.)

Os conquistadores espanhóis chegaram ao Novo Mundo e conheceram muitas plantas cujos extratos eram empregados pelos Maias e Aztecas. Uma destas plantas, o urucum, existente ao longo da América Tropical, era usado como extrato para tingir tecidos e pintar o corpo, além de ser utilizada junto à vanilina na formulação de uma bebida a base de cacau. O nome científico do urucum, *Bixa orellana* L. foi dado por Francisco Orellana, após uma expedição na região da Amazônica Setentrional (GIULIANO, 2003; CUEN *et al.*, 2003).

O urucum (*Bixa orellana* L.) é uma planta da família Bixaceae, oriunda do leste dos Andes, América do Sul, Índia, Oeste da África e Filipinas. Pode atingir de 2 a 6 metros de altura, têm folhas codiformes, são caducas, caindo anualmente após a grande colheita no período de setembro a outubro, pontudas e dentadas, flores grandes hermafroditas de cor rósea ou lilás, com cinco sépalas nas extremidades dos galhos, formando fascículo; deles nascem cápsulas ovóides, com dois carpelos cobertos de espinhos flexíveis contendo cada um 30 a 50 sementes cobertas de uma polpa mole, tenaz, vermelha constituindo dessa forma o pigmento propriamente dito (FIG. 1) (GALINDO-CUSPINERA *et al.*, 2002 e BALIANE, 1992).

As cápsulas são bi e trivalvares, podem se apresentar de coloração vermelha ou esverdeada. A frutificação inicia-se a partir do segundo ano; no terceiro, a produção já é considerada comercializável (SOUZA, 2001).



FIGURA 1 – FOTOS DE URUCUM. A: urucuzeiro **B:** flor do urucum; **C:** fruto verde; **D:** fruto maduro; **E:** fruto aberto com sementes expostas; **F:** sementes de urucum.

O urucuzeiro pode viver até 50 anos, sendo de 30 a sua vida útil econômica (BALIANE, 1982). Segundo CARVALHO e HEIN (1989), devido a sua ampla distribuição geográfica, é responsável por mais de 50 nomes diferentes. São conhecidas hoje, diversas variedades, entretanto, as mais comuns são: Focinho de Rato, Cabeça de Moleque, Peruana e Wagner. Esta última apresenta vantagens sobre as demais; além de possuir suas cápsulas indeiscentes (não se abrem ao secar no pé) são trivalentes, tendo em média 104 sementes por cápsula, ou seja, o dobro das demais variedades nativas conhecidas (BALIANE, 1982).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de grãos de urucum. Da produção brasileira, cerca de 70% dos grãos produzidos destinam-se ao processamento de colorau (corante doméstico), 20% são utilizados na produção do corante e 10% são exportados (BATISTA, 1994).

Trata-se de uma cultura que vem conquistando cada vez mais importância econômica, despertando interesse de indústrias de produtos cosméticos, farmacêuticos e, principalmente, de alimentos (coloríficos, salsicharia e massas alimentícias) em face da crescente limitação da utilização de corantes sintéticos.

O consumo de urucum tem aumentado muito nas últimas décadas. Excluídas as demandas internas, o comércio internacional médio anual de urucum é estimado em cerca de 10000 toneladas, sendo dois terços desta produção na forma de semente bruta e o restante como extrato. A América Latina produz 60 % de todo o urucum consumido no mundo, seguido pela África com 27% e a Ásia 12%. Os preços da semente dependendo da produção e da variedade oscilaram de US\$ 2000 a US\$ 660 por tonelada entre 1985 a 1995. Estes preços também são proporcionais ao conteúdo de bixina, o qual em alguns casos deve ser maior que 2,7 % (GIULIANO, 2003). Só o Peru, maior produtor mundial, exportou em 1990, cerca 2000 toneladas, equivalente à demanda mundial em 1970. Sua produção em 2000 subiu para 4482 toneladas. Outros grandes exportadores são a Bolívia, Brasil, Equador, México, República Dominicana, Colômbia, Kênia, Sri Lanka, Senegal, Costa do Marfim e Índia. Em menores quantidades também é produzido na: Nicarágua, Jamaica, Paquistão, Malásia, Filipinas, Tanzânia e Angola (CUEN *et. al.*, 2003; MAY, 1997).

Embora o uso do urucum não tenha restrições nos EUA, existem algumas restrições de uso na Europa onde, atualmente, a ingestão diária permitida (ADI) de urucum é 0 – 2,5 mg/Kg de peso corporal /dia (para preparações que contenham 2,6% do carotenóide bixina) e 0 – 0,065 mg/Kg de peso corporal/dia (para pigmentos puro) (JECFA, 1982). Em contraste, países da América Latina excedem a ADI. No Brasil, o pericarpo das sementes de urucum é triturado e misturado com farinha de milho, conhecido como colorau e usado como condimento alimentar (FERNANDES *et al.* 2002).

BRESSANI *et. al.*, (1983) conduziram estudos efetuando análises das sementes com enfoque especial para seu valor nutricional. Os resultados revelaram: elevado teor de fibras totais (16%); alto de teor de fósforo e baixo de cálcio e elevada quantidade de proteína, (13 a 17 %). O valor nutricional de proteína corresponde a cerca de 65 % daquele encontrado na caseína, usada como referência. Em quantidades majoritárias estavam presente os aminoácidos lisina e triptofano e, em menor quantidade: metionina, isoleucina, leucina, fenilamina e treonina. A análise da semente apresenta 17,5% de lípido entre eles, o ácido linoléico, α -linoléico e o oléico.

Segundo os autores, a deficiência de aminoácidos, particularmente metionina faz da farinha do urucum um produto de baixo valor biológico. Também foi constatada a

baixa digestibilidade da proteína, 57% comparada a 94 % para a caseína. Sugeriram também que, mais de 50% das fibras podem ser eliminadas por peneiramento da farinha trazendo conseqüentemente, um aumento da digestibilidade.

2.1.1 – PIGMENTOS DO URUCUM

O urucum é uma mistura de pigmentos de coloração amarelo-alaranjada em conseqüência da presença de vários carotenóides, com predominância absoluta de um atípico, conhecido como bixina.

O principal composto encontrado em extratos a base de óleo ou gordura das sementes de urucum é o carotenóide bixina, indexado com o número 75120 pelo *Color Index* e com o número EEC nº E160 b pela União Européia, que é o monometiléster do ácido dicarboxílico norbixina (MARMION, 1991).

A bixina foi citada pela primeira vez em 1825 por BOUSSINGAULT, sua cristalização foi obtida com sucesso em 1878 por ETTI, a análise elementar e determinação de sua fórmula empírica foram realizadas em 1917 por HEIDUSCHKA E PANZER e em 1928 - 1933 KUHN e colaboradores prepuseram a fórmula estrutural a qual foi confirmada posteriormente por KARRER e colaboradores através da síntese total da per-hidronorbixina (KARRER e JUCKER, 1950).

A bixina possui uma cadeia isoprênica de 24 carbonos, contendo um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades, perfazendo assim a fórmula molecular $C_{25}H_{30}O_4$.

O teor de bixina presente nas sementes de urucum varia de acordo com a variedade da cultura, do solo, do clima e dos tratos culturais, podendo encontrar sementes com menos de 1% e até com mais de 4% de bixina. Na semente bruta sua concentração pode chegar até 5,0%. Contudo, diferentes variedades de sementes apresentam teores às vezes inferiores a 2,0 %. O valor comercial da semente é baseado no percentual de bixina. Teores mínimos de 2,5% são normalmente exigidos para exportação.

De acordo com BOUVIER *et al.* (2003), o mecanismo da biossíntese da bixina ainda não está esclarecido. Contudo, tem sido sugerido que um carotenóide C_{40} , provavelmente o licopeno, possa ser o precursor da bixina. Com base na estrutura

similar entre a bixina e a crocetina, pigmento do açafrão, a reação poderia envolver a metil transferase e a desidrogenase em uma série de reações precedidas sequencialmente pelo licopeno. A suposta rota é sustentada pela análise de derivados de decomposição do licopeno que se encontram acumulados em traços na semente do urucum (FIG.2).

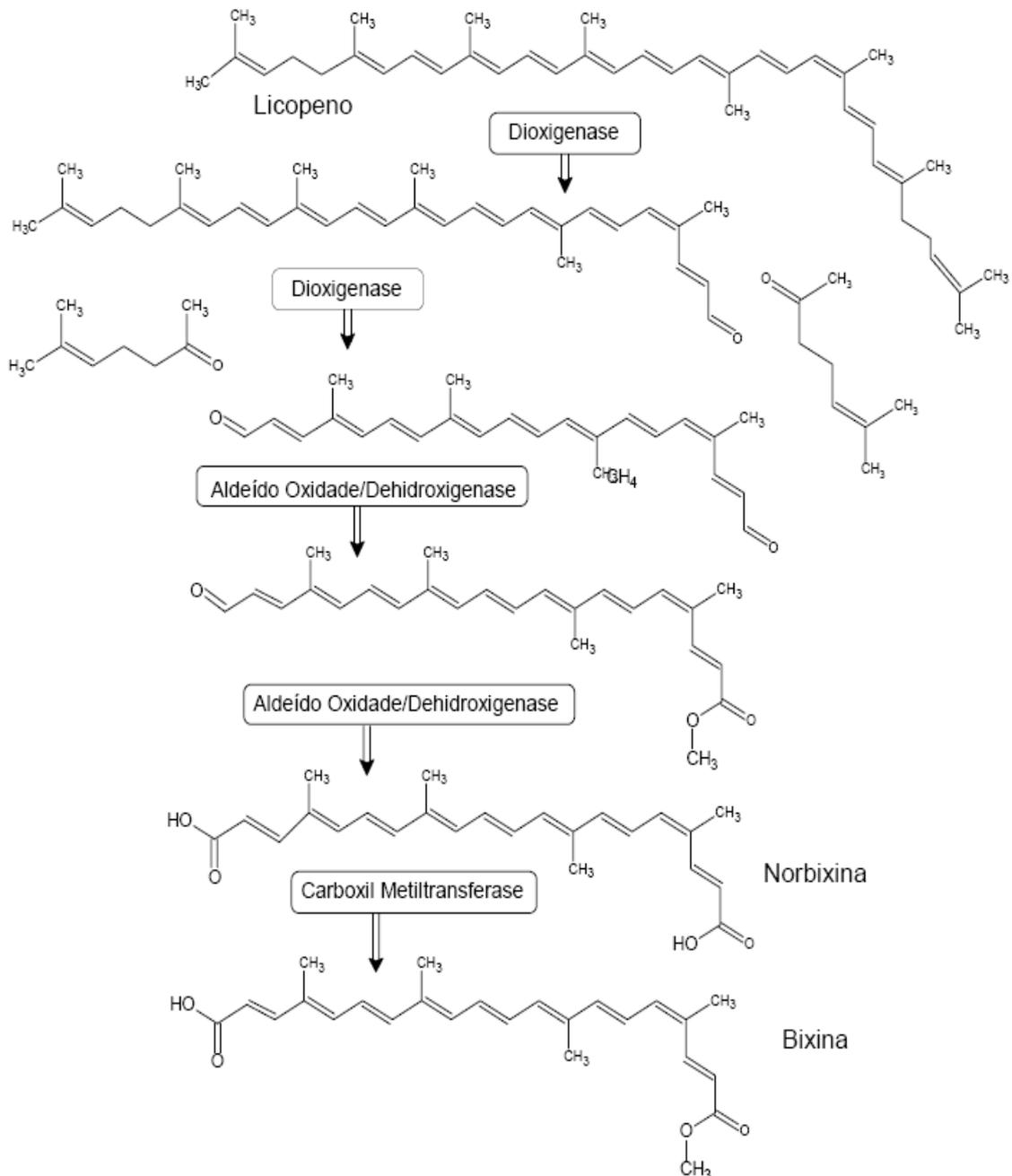


FIGURA 2 – ROTA PROPOSTA DA BIOSÍNTESE DA BIXINA A PARTIR DO LICOPENO. Fonte: (JAKO *et al*, 2002).

O comportamento químico do extrato do urucum é essencialmente o representado pela estrutura da bixina, um material cristalino vermelho-marrom que se funde a 198° C. É moderadamente estável a luz e tem boa estabilidade frente a oxidação, mudança de pH e ataque microbiano. A bixina é muito estável até temperaturas de 100° C, sendo pouco estável a temperaturas de 100 a 125° C, onde tende a formar o ácido 13-carbometoxi-4,8-dimetiltridecahexano-oico (MARMION, 1991).

O cromóforo da bixina é o sistema conjugado de ligações dupla que conferem a cor particular a bixina, mas estas ligações duplas conjugadas também são a fonte da susceptibilidade da bixina a alterações pelo oxigênio e esta é a maior causa da sua perda de cor, assim como em outros carotenóides (COLLINS, 1992).

FARIA (1998) e CASTRO (1992) fizeram uma compilação das propriedades dos extratos das sementes de urucum apresentadas por vários autores, comitês e organismos internacionais de controle de aditivos em alimentos e saúde. As propriedades mais importantes serão apresentadas a seguir.

Propriedades da bixina: lipossolúvel, solúvel em clorofórmio, acetona, éter etílico, etanol, etc. e insolúvel em água; absorvância máxima a 439 nm, 470 nm e 501 nm em clorofórmio e a 526 nm, 491nm e 457 nm em dissulfeto de carbono, ponto de fusão 198° C, coloração amarela em extrato diluído e vermelha escura em extrato concentrado, instável a luz e a temperaturas acima de 125° C.

A norbixina, também proveniente das sementes de urucum, tem poder de coloração similar ao da bixina.

A conversão de bixina em norbixina é feita pela diluição da bixina em meio alcalino, a bixina perde uma molécula de metanol produzindo a norbixina, pigmento de cor vermelho intensa que após a separação e secagem é comercializada na forma de pó ou pasta (CARVALHO e HEIN, 1989). As propriedades mais importantes serão apresentadas a seguir.

Propriedades da norbixina: hidrossolúvel, insolúvel em álcool, propileno glicol, óleo e gordura, absorvância máxima a 527 nm, 491 nm, e 458 nm em dissuleto

de carbono e ponto de fusão de 300° C. A norbixina é instável na presença de luz e em solução quando se muda o pH.

Na Figura 3 são apresentadas as estruturas moleculares da *cis* e *trans* bixina e *cis* e *trans* norbixina:

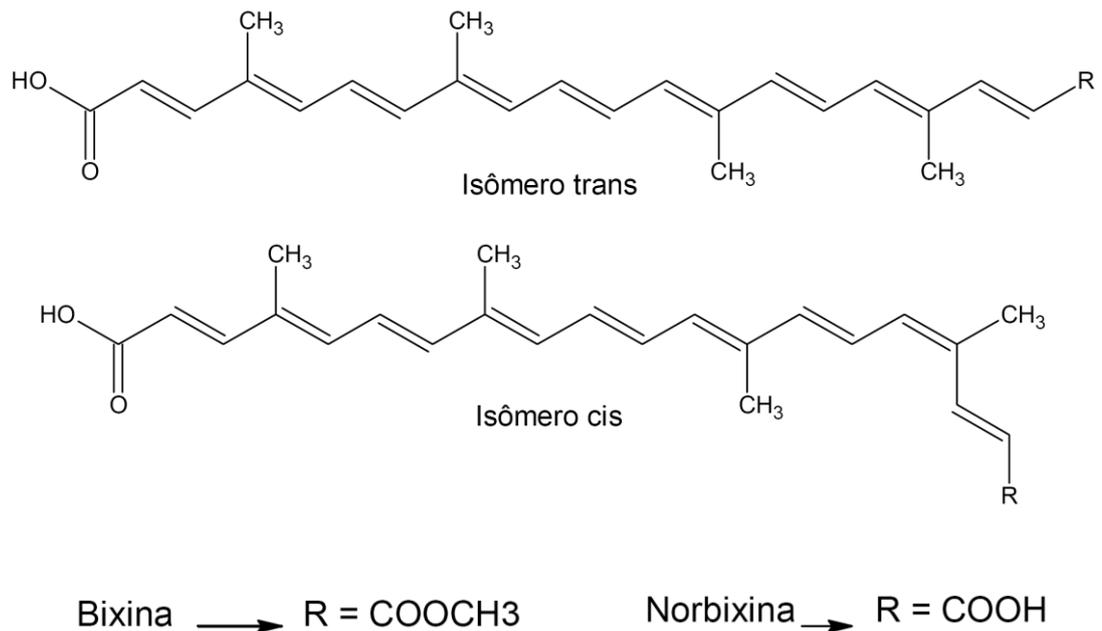


FIGURA 3 – ESTRUTURA DOS CAROTENÓIDES *CIS* E *TRANS* BIXINA E NORBIXINA.

A *cis*-bixina (monometiléster do ácido dicarboxílico norbixina) é o constituinte que ocorre em maior concentração no arilo da semente do urucum, representando cerca de 80% da bixina presente. Além do isômero *cis* (metil-hidrogênio 9'-*cis*-6,6'diapocaroteno 6,6'dioato), também está presente a forma *trans*, sendo este mais estável que o isômero *cis*. A *trans* isomerização acontece parcialmente quando o pigmento é submetido a processo de aquecimento (GALINDO-CUSPINERA, 2002).

Vários outros carotenóides (C₁₉, C₂₂, C₂₄, C₂₅, C₃₀, C₃₂) foram isolados e identificados, porém constituem a parcela minoritária dos pigmentos. MERCADANTE *et al.* (1997), isolaram cinco apocarotenóides e identificaram a estrutura de três outros até então desconhecidos, presentes no arilo da semente de urucum. O metil (7 *Z*, 9 *Z*, 9' *Z*)-apo-6'-licopenoato, o metil (9 *Z*)-apo-8'-licopenoato, e o metil 1(all-*E*)-apo-8'-

licopenoato, foram os três novos carotenóides encontrados. Os compostos; metil (all-E)-8-apo-betacaroten-8'-oate e o metil (all-E)-apo-6'-licopenoate, não tinham antes sido encontrados no urucum.

MERCADANTE *et.al.* (1999) isolaram três outros apo carotenóides do urucum (*Bixa orellana* L.): o 6-geranilgeranil-8'-metil-6,8'-diapocaroten-6-8'-dioato; o 6'-geranilgeranil-6'-metil-(9 Z)-6,6'-diapocaroten-6-6'-dioato e o 6-geranilgeranil-6'-metil-6-6'-diapocaroten-6-6'-dioato. Relatam os autores, ter sido esta, a primeira vez que foi encontrado o geranilgeraniol esterificado com um ácido carboxílico carotenóico.

A instabilidade dos pigmentos do urucum pela luz, calor e pela oxidação na presença de alguns solventes é objeto de estudo de vários pesquisadores (FARIA, 1998). Estes estudos procuraram explicar o mecanismo de degradação e também tiveram como objetivo estabelecer várias faixas operacionais para o processamento destes pigmentos.

O extrato de urucum tem uma estabilidade considerável à oxidação pelo ar em meio anidro, mas uma resistência mais baixa aos efeitos da luz, os quais são proporcionais à intensidade desta. A persistência da cor sob forte iluminação pode ser aumentada pela adição de palmitato de ascorbil. A presença de radicais livres ou, qualquer promotor dessas espécies em extratos de urucum deve ser evitada, pois estudos indicam que pode ocorrer uma perda rápida de cor sempre que for promovida a formação de radicais livres (NAJAR *et al.*, 1988).

As diferenças nas propriedades corantes dos extratos de sementes de urucum resultam dos processos de extração, onde há, muitas vezes, a formação de produtos com diferentes tonalidades e solubilidade (CARVALHO e HEIN, 1989).

Embora o uso do urucum não tenha restrições nos EUA, há algumas restrições de uso na Europa onde, atualmente, a ingestão diária permitida (ADI) de urucum é 0 – 2,5 mg/Kg de peso corporal /dia (para preparações que contenham 2,6% do carotenóide bixina) e 0 – 0,065 mg/Kg de peso corporal/dia (para pigmentos puro) (JECFA, 1982). Em contraste, países da América Latina excedem a ADI. No Brasil, o pericarpo das sementes de urucum é triturado e misturado com farinha de milho, conhecido como colorau e usado como condimento alimentar (FERNANDES *et al.* 2002).

2.1.2 – IMPORTÂNCIA DOS CAROTENÓIDES NA DIETA

Os carotenóides são fundamentais na dieta dos animais. Em vários mamíferos eles participam dos processos bioquímicos a exemplo da conversão do beta caroteno em vitamina A (FONTANA *et al.*, 1997).

Hoje é sabido que, nas plantas, os carotenóides funcionam como pigmentos absorvedores de luz, transferindo esta energia para a clorofila no mecanismo da fotossíntese. Os carotenóides também agem como filtros de radiação ultravioleta, protegendo as plantas da foto-oxidação, prevenindo as células de danos provocados pelo oxigênio simpleto. Ainda, em situações de estresse ou ferimentos, ou sujeitos a severa exposição à luz, estes compostos protegem as plantas de futuras infecções ou dano oxidativo (CHAUDHRY, 2003).

No ser humano é relatado existir uma relação inversa ao risco de câncer associado à presença na dieta, de determinados carotenos como o licopeno e β -carotenos, identificado com frequência em tecidos e órgãos como: tireóide, fígados, rins, coração, testículos, tecido adiposo e pâncreas. A luteína e a zeaxantina acumuladas na retina atuam fundamentalmente como fotoprotetores das células contra radicais originados do oxigênio pela ação da luz (QING, 2002).

Os carotenóides executam várias funções biológicas, em particular, eles têm um importante papel na proteção da célula como antioxidantes contra radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio molecular simpleto (KIOKIAS e GORDON, 2003).

A atividade antioxidante da luteína, licopeno, urucum, β -caroteno e γ -tocoferol, foi avaliada em triacilgliceróis sob o efeito do ar e da luz. Foi relatado que a luteína, o licopeno e o β -caroteno atuam com pro-oxidantes, favorecendo a formação de hidroperóxidos; contudo, se uma pequena quantidade de γ -tocoferol for adicionada a estes pigmentos, o fenômeno é revertido e eles atuam como antioxidantes com uma atividade mais alta do que o γ -tocoferol. O urucum mostrou atividade antioxidante, contudo, isto poderia ser devido a compostos fluorescentes desconhecidos. Foi sugerido que os carotenóides podem ser usados em alimentos para prevenir a degradação de outros componentes (COLLINS e DOWNHAN, 2000).

Pesquisas têm mostrado que os carotenóides têm fornecido benefícios contra doenças relacionadas com a idade, contra algumas formas de câncer (em especial câncer de pulmão), acidente cardiovascular, degeneração macular e catarata (DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000, COLLINS e DOWNHAN, 2000).

Vários estudos têm sido realizados no sentido de avaliar o potencial protetor de compostos antioxidantes relacionados aos efeitos nocivos da oxidação. Durante os processos bioquímicos, EROs e outros radicais com alta energia são às vezes formados. Estes, uma vez presentes, podem interagir com vários constituintes das células, incluindo lipídios, carboidratos, proteínas e DNA, causando a perda de suas funções específicas na célula.

Muitos são os compostos naturais com potencial oxidante, entre eles destacam-se: polifenóis, tocotrienóis e tocoferóis (vitamina E); alguns aminoácidos, com destaque para a cisteína, primeiro antioxidante estudado *in vivo* como protetor contra radiação ionizante; a vitamina C, como também os flavonóides e os fitoquímicos. Ainda, dentre estes se incluem os carotenóides, do qual fazem parte a bixina, o licopeno, a astaxantina e a vitamina A, aos quais se têm dado grande enfoque nos dias atuais.

Segundo LIMA *et al.* (2003), o efeito antioxidante da bixina e norbixina tem importância na prevenção de aterosclerose. Uma vez que as lesões ateroscleróticas iniciam-se após algum tipo de lesão no endotélio, cujo dano é causada principalmente pela lipoproteína LDL oxidada, a inibição da oxidação, resulta na proteção do endotélio.

ZHANG *et al.* (1991) estudaram o efeito de inibição da peroxidação, avaliando alguns carotenóides, entre estes, o beta-caroteno, a castaxantina, a luteína, o alfa-tocoferol, o licopeno e a bixina, constatando a eficácia na inibição dos conseqüentes efeitos de transformações neoplásticas induzidas quimicamente. De todos os carotenóides testados, o alfa tocoferol foi o mais ativo inibidor da peroxidação lipídica, seguido pela bixina.

2.1.3 – ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES

O radical livre é um átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons não pareados. A presença deste elétron não pareado altera a reatividade química dos átomos

ou moléculas, tornando-os mais reativos que as espécies não radicalares (com os elétrons pareados). O radical hidrogênio ($H\bullet$), que contém um (1) próton e um (1) elétron é o mais simples de todos os radicais. As reações em cadeia dos radicais livres são, então, iniciadas pela remoção (abstração) do ($H\bullet$) de outras moléculas, como, por exemplo, durante a peroxidação lipídica (FREI, 1994).

O termo espécies reativas de oxigênio é um coletivo que inclui não somente radicais de oxigênio como o radical superóxido (O_2^-) ou hidroxila ($\bullet OH$), mas, também, alguns derivados não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso ($HOCl$) (HALLIWELL *et al.*, 1992), conforme demonstrado na Tabela I.

TABELA I – Algumas espécies reativas de oxigênio, juntamente com sua meia-vida, em segundos.

ALGUMAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO		
Espécie Reativa de Oxigênio		Meia-vida (segundos)
$HO\bullet$	Radical hidroxila	10^{-9}
$HOO\bullet$	Radical hidroperoxila	10^{-8}
$RO\bullet$	Radical alcoxila	10^{-6}
$ROO\bullet$	Radical peroxila	7
$ONOO\bullet$	Peroxinitrito	0,05 - 1
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio	variável
O_2^-	Radical superóxido	variável
1O_2	Oxigênio simpleto	10^{-5}
NO	Radical óxido nítrico	1 -10
HOCl	Ácido hipocloroso	estável

OBS: R é um lipídeo, por exemplo, o linoleato

Fonte: (JORDÃO Jr, *et al.*, 1998).

Um radical livre é capaz de existir independentemente. Apresentam, em geral, uma grande instabilidade, têm uma vida muito curta e reagem rapidamente com diversos compostos e podem atacar alvos celulares. Os tipos de reação dos radicais livres podem levar à formação de complexos com proteínas, glicoproteínas, purinas e pirimidinas, formação de produtos de oxidação de tióis, peróxidos lipídicos, polímeros, epóxidos, endoperóxidos e produtos de cissão, como alquenais e hidroalquenais, que são citotóxicos. A oxidação de tióis, a ligação covalente de alquenais com proteínas e a

modificação das glicoproteínas podem afetar a atividade enzimática (HALLIWELL, 1994).

O estresse oxidativo tem sido definido como um distúrbio no estado de equilíbrio, no sistema de pró-oxidantes e antioxidantes, nas células intactas. Esta definição implica no fato de que a célula deve ter um sistema onde exista um equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs durante o metabolismo aeróbico, normal. Quando existe maior ocorrência de eventos oxidativos, o sistema pende para o lado pró-oxidativo, o que pode afetar os níveis de antioxidantes como a glutatona e a vitamina E, tendo, como resultado final, o dano oxidativo em lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. A severidade deste processo pode levar à morte celular (JORDÃO Jr *et al.*, 1998).

Os sistemas biológicos oferecem condições favoráveis para ocorrência de reações de caráter oxidativo, devido à existência de lipídios insaturados, nas membranas celulares, e pela abundância de reações oxidativas que ocorrem durante o metabolismo normal. A susceptibilidade de uma célula ou de um tecido ao estresse oxidativo depende de um grande número de fatores, incluindo a disponibilidade de antioxidantes e a capacidade de inativação ou eliminação dos produtos oxidados formados (JORDÃO Jr *et al.*, 1998)

Antioxidantes são compostos que previnem a formação ou seqüestram os radicais livres e interrompem a cadeia de reações de propagação. Os antioxidantes endógenos ajudam a eliminar as espécies reativas, entre estes antioxidantes estão: a glutatona, nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (NADPH), a coenzima Q (ubiquinona), o ácido úrico e certas enzimas como a superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase. Há ainda as proteínas ligantes de metais como albumina, metalotioneína, ceruloplasmina e transferrina. Entre os antioxidantes dietéticos estão o ácido ascórbico, carotenóides, tocoferóis, compostos polifenólicos e flavonóides (MEYDANI *et al.*, 1994).

Os antioxidantes podem ser classificados, didaticamente, em duas categorias: o sistema primário, que são os inibidores preventivos, que retardam a fase de iniciação, impedindo a geração de espécies reativas ou seqüestram estas espécies, impedindo sua interação com os alvos celulares. O sistema secundário consiste nos bloqueadores da etapa de propagação da cadeia radicalar (*chain breaking*), que, efetivamente, removem

radicais intermediários, como o radical peroxila ou alcoxila. Os inibidores preventivos podem induzir a decomposição de hidroperóxidos para produtos inativos. Exemplos são os tióis, sulfetos, catalases, peroxidases e as glutathionas peroxidase e transferase (JORDÃO Jr *et al.*, 1998).

A eficácia do sistema antioxidante depende muito de qual tipo de molécula é a geradora do estresse oxidativo e da localização intra ou extracelular dessa molécula. Como exemplo, temos que o dano à membrana celular pode ser mais eficazmente prevenido pela vitamina E, que reage com radicais peroxila e hidroxila, do que pelos carotenóides, que atuam reagindo com o oxigênio simpleto.

A superóxido dismutase (SOD) atua como um inibidor preventivo, reduzindo o ânion superóxido ao peróxido de hidrogênio. Os supressores do oxigênio simpleto, como o β -caroteno e a vitamina E, assim como os agentes quelantes, como peptídeos, ácidos orgânicos e certos fosfatos orgânicos ou inorgânicos, podem também ser considerados como antioxidantes preventivos (BONORDEN e PARIZA, 1994).

Quanto ao consumo dos antioxidantes do plasma, a ordem teórica de preferência, no processo de peroxidação lipídica, é a seguinte: vitamina C = tióis (GSH) > bilirrubina > ácido úrico > vitamina E (JACOB, 1995).

Recentemente muita atenção tem sido voltada para os derivados polifenólicos (flavonóides, taninos, ácidos fenólicos e cumarinas, entre outros) produzidos no metabolismo secundário de plantas, como agentes antioxidantes de origem alimentar. Estudos epidemiológicos mostram que a ingestão de grande quantidade de alimentos ricos em antioxidantes está inversamente relacionada ao risco de aterosclerose (SCALBERT *et al.*, 2005). Os estudos em animais e culturas de células confirmam estes efeitos protetores dos antioxidantes (BOREK, 2004).

Os flavonóides inibem a lipoperoxidação *in vitro* no estágio de iniciação atuando como seqüestradores de ânions superóxido e radicais hidroxila. Têm sido proposto ainda, que os flavonóides bloqueiam as reações radicalares em cadeia através da doação de átomos de hidrogênio aos radicais peroxila, formando um flavonóide-radical. Os flavonóides-radicais reagem com os radicais livres terminando assim, a cadeia de propagação. Além das suas propriedades antioxidantes, alguns flavonóides atuam como agentes quelantes de metais e inibem a formação de radical hidroxila através da reação

de Fenton, a qual é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (BRAVO, 1998).

É consistente a hipótese dos benefícios associados ao consumo de vegetais e a redução dos riscos de enfermidades crônicas relacionadas à ingestão de uma dieta de carotenóides, relatam QING *et al.* (2002), após examinarem diversas pesquisas.

WEISS *et al.* (2003) fizeram um levantamento de inúmeras substâncias potencialmente antioxidantes, dentre elas encontra-se a bixina. Outras aplicações farmacológicas são citadas como, por exemplo, o emprego destas substâncias como agentes foto protetores utilizadas em tratamentos radioterápicos.

2.2 - METABOLISMO DE COLESTEROL, LIPOPROTEÍNAS E SUA RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DA ATEROSCLEROSE

A síntese do colesterol ocorre no citoplasma das células com enzimas do citosol e retículo endoplasmático.

O pool total de colesterol hepático é um balanço entre o colesterol adquirido exogenamente e produzido endogenamente e o colesterol eliminado do fígado. O colesterol adquirido exogenamente provém da dieta e o produzido endogenamente provém de sua síntese nos tecidos extra-hepáticos ou a partir da síntese de novo no fígado. A eliminação do colesterol do fígado se dá como colesterol inalterado na bile, como um componente das lipoproteínas do plasma enviadas aos tecidos periféricos ou como sais biliares secretados na luz intestinal (CHAMPE e HARVEY, 2002).

O precursor de todos os átomos de carbono no colesterol e dos seus derivados esteróides é o grupo acetil da molécula de acetil-CoA. Os passos na biossíntese do colesterol envolvem uma via complexa com cerca de 21 etapas. A condensação de três grupos acetila leva à formação do mevalonato, que contém seis carbonos. A descarboxilação do mevalonato produz uma unidade isopreno de cinco carbonos, que é um ponto fundamental na biossíntese dos esteróides e de muitos outros compostos. Seis unidades de isopreno condensam-se para formar o esqualeno, que contém 30 átomos de carbono. Este sofre ciclização para formar o lanosterol, que após a perda de três grupos

metila, origina o colesterol. É importante ressaltar que a reação catalisada pela enzima 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA (HMG-CoA) redutase, que converte acetil-CoA em mevalonato, é fundamental para a formação de colesterol (CAMPBELL, 2001).

A estrutura em anel do colesterol não pode ser metabolizada a CO₂ e H₂O em seres humanos. Em vez disto, o anel esterol intacto é eliminado do corpo por conversão em ácidos biliares, os quais são excretados nas fezes e secreção do colesterol na bile, a qual transporta-o ao intestino para eliminação (CHAMPE e HARVEY, 2002).

O colesterol é transportado de um tecido para outro pelo plasma sanguíneo através das lipoproteínas, que são agregados moleculares formados por associações entre lipídeos e proteínas. A fração protéica das lipoproteínas é denominada apolipoproteína (“apo”) e se subdivide em classes, sendo que cada classe possui várias subclasses. As principais classes de lipoproteínas (TAB II) humanas são: quilomícrons (QM), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (GOTTO, *et al.*, 2004 e PASQUALUCCI *et al.*, 1999).

Além da IDL, a outra lipoproteína em menor quantidade é a Lp(a), que é semelhante a LDL, mas contém uma glico-proteína adicional, denominada apolipoproteína (a) [apo (a)], acoplada à apo B por pontes de dissulfeto. Tal glicoproteína pertence à família do plasminogênio e atua como um inibidor competitivo do ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) inibindo a geração da plasmina e a fibrinólise, características que conferem à lipoproteína *a* (Lp(a)) propriedades pró-aterogênicas. A concentração plasmática da Lp(a) é determinada pelo gene da apo(a) localizado no cromossomo 6. Nada menos que 34 isoformas de apo(a) foram descritas. O tamanho da cadeia peptídica da apo (a) é decorrente do número de *kringles* ou alças IV semelhantes ao plasminogênio determinados pelo gene (SANTOS *et al.*, 2001).

Aparentemente, a Lp(a) não tem nenhuma função no transporte de lipídeos. Portanto, sua ausência do plasma não acarreta transtornos metabólicos. Pelo contrário, diversos estudos, inclusive prospectivos têm demonstrado que a Lp(a) representa um fator de risco independente para aterosclerose coronariana e de artérias cerebrais nas raças branca e amarela. Na raça negra, a concentração plasmática dessa lipoproteína é elevada, sem que haja correlação com a aterosclerose (SANTOS e MARANHÃO, 2000; KLAUSEN *et al.*, 1997).

Os quilomícrons são as partículas de lipoproteínas de menor densidade e maior tamanho e contém a maior porcentagem de lipídeos (cerca de 85% a 95% em triacilgliceróis) e a menor porcentagem de proteína (1% a 2%). As VLDLs e LDLs são sucessivamente mais densas tendo um maior conteúdo de proteína (cerca de 10% em VLDL e 25% em LDL) e menor conteúdo lipídico. As partículas HDL são as mais densas lipoproteínas plasmáticas com cerca de 50% de proteínas, 20% colesterol (maioria esterificado) e 30% de fosfolipídeos e somente traços de triacilgliceróis (BACHORIK *et al.*, 2000).

TABELA II – Principais classes e características das lipoproteínas plasmáticas.

Principais classes e características das lipoproteínas plasmáticas								
Lipoproteínas	Densidade (g/dL)	Diâmetro (A)	Composição				Apolipoproteínas	
			CE	CL	TG	FL		PR
Quilomícrons	< 0.95	800-5.000	5	2	84	7	2	B-48;E;C AI;A-II;A-IV
VLDL	< 1.006	300-800	12	7	55	18	8	B-100;E;C
IDL	1.006-1.019	250-350	23	8	32	21	16	B-100;E;C
LDL	1.019-1.063	180-280	38	10	9	22	21	B-100
HDL-2	1.063-1.125	90-120	16	6	4	30	44	A-I;A-II
HDL-3	1.125-1.210	50-90	12	3	4	26	55	A-I;A-II

CE- colesterol esterificado; CL- colesterol livre; TG- triacilgliceróis; FL- fosfolipídeos; PR-proteínas.

Fonte: III Diretrizes Brasileiras de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (SANTOS, *et al.*, 2001).

Estudos epidemiológicos estabeleceram que as lipoproteínas apresentam importante papel nos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças ateroscleróticas (PUSKA *et al.*, 2002).

As lipoproteínas são estruturas que contêm na sua face externa apolipoproteínas, fosfolipídeos e colesterol não-esterificado e no interior, éster de colesterol e triacilgliceróis. Os principais tipos de apolipoproteínas são: AI, AII, B-100, B-48, C-I, C-II, C-III, E (E2/E3/E4) (MARTINEZ, 2004). As apolipoproteínas têm diversas funções no metabolismo das lipoproteínas como: montagem da partícula (apo B100 e B48), ligantes

a receptores de membrana que captam lipoproteínas para o interior da célula (apo B100 e apo E) ou co-fatores enzimáticos (apos CII, CIII e AI).

As fontes de fornecimento colesterol no organismo são pela síntese interna (endógena) e da dieta (exógena). Os quilomícrons são os responsáveis pelo transporte dos lipídeos da dieta (via exógena) (COOPER, 1997). O transporte de lipídeos de origem hepática ocorre por meio da VLDL e LDL, que caracteristicamente contém apoB-100 (via endógena). Os triacilgliceróis das VLDL, assim como os dos quilomícrons, são hidrolizados pela lipase lipoprotéica (GOLDBERG, 1996). Os ácidos graxos são liberados para os tecidos podendo ser metabolizados ou estocados na forma de triacilgliceróis.

Os quilomícrons se transformam em remanescentes que são removidos pelo fígado por receptores específicos, sendo que o mais aparente é o receptor da LDL (COOPER, 1997). Uma parte das VLDL se transforma em LDL após a perda de componentes de superfície lipídicos e protéicos. As VLDL trocam triacilgliceróis por ésteres de colesterol com as HDL e LDL por intermédio da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) (TALL, 1993). Tanto as VLDL como as LDL serão removidas pelo fígado por intermédio de ligação com receptores específicos (BROWN, 1986). Dentre eles, o receptor da LDL também denominado receptor B-E é o mais importante. A expressão desses receptores é a principal responsável pelo nível de colesterol no sangue e depende da atividade da enzima HMG-CoA redutase que é a enzima limitante da síntese do colesterol hepático (PEASE *et al.*, 1996).

As partículas de HDL são formadas no plasma e compartimento extra-vascular. A apo A-I e a apo AII representam o principal conteúdo protéico da HDL. O colesterol livre da HDL ou de outras lipoproteínas pode ser esterificado pela ação da lecitina colesterol acil transferase (LCAT), presente na HDL. Este colesterol esterificado é então transportado até o fígado onde será metabolizado, caracterizando o chamado transporte reverso do colesterol (SANTOS *et al.*, 2001; FIELDING e FIELDING, 1995).

2.3 – DISLIPIDEMIAS

A hiperlipidemia, ou seja, aumento dos níveis de triacilgliceróis ou colesterol é a principal causa de aterosclerose e doenças associadas à aterosclerose, tais como doença cardíaca coronariana, doença cerebrovascular isquêmica e doença vascular periférica.

Uma das grandes preocupações que afetam hoje a humanidade está relacionada a alguns tipos de lipídeos ou compostos que contém lipídeos, presentes na corrente sanguínea, que podem provocar distúrbios cardiocirculatórios, como, infarto do miocárdio e derrame cerebral, com conseqüências graves. O teor elevado de colesterol no organismo é causado, principalmente, por maus hábitos alimentares adquiridos ou de ordem genética (LIMA, 2001).

Um adulto ingere cerca de 60 a 150 g de lipídios por dia, dos quais mais de 90% normalmente são constituídos de triacilgliceróis. O restante dos lipídeos da dieta correspondem ao colesterol, ésteres de colesterol, fosfolipídeos e ácidos graxos não-esterificados (“livres”) (CHAMPE e HARVEY, 2002).

O acúmulo de VLDL no compartimento plasmático resulta em hipertrigliceridemia, principalmente, podendo ocorrer também hiperlipidemia mista, ou seja, hipertrigliceridemia associada a hipercolesterolemia. O aumento de VLDL pode ser devido a aumento da produção da lipoproteína pelo fígado ou diminuição da catabolização da VLDL, isto é, redução do processo de lipólise de lipoproteína, catalisado pela lipase da lipoproteína.

Uma diminuição da síntese da lipase da lipoproteína ou mutações no gene dessa enzima são causas de diminuição da lipólise o que pode ocasionar um acúmulo de VLDL e hipertrigliceridemia (MCINTYRE e HARRY, 1991).

O acúmulo da LDL no compartimento plasmático resulta em hipercolesterolemia, podendo ocorrer por defeito no gene do receptor de LDL com conseqüente *déficit* na expressão ou função dos receptores de LDL, diminuindo o catabolismo da lipoproteína, especialmente pelo fígado. Até o momento, mais de 250 mutações do receptor de LDL foram detectadas em portadores de hipercolesterolemia familiar (SILVA *et al.*, 2001).

A relevância das dislipidemias como problema de saúde pública está na sua relação com as doenças cardiovasculares (DCV), principalmente como fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose. Está muito bem estabelecido as correlações existentes entre o risco para a doença aterosclerótica coronariana (DAC) e concentrações séricas elevadas de colesterol total (CT), principalmente na forma de colesterol em lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), e baixas concentrações de colesterol em lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) (CHEN *et al.*, 2004; BALKAN *et al.*, 2004; STOCKER e KEANEY, 2004; KWITEROVICH, 2000)

Um outro agravante são os níveis elevados de triacilgliceróis (TG), que se não for fator de risco isolado para aterosclerose, acabam potencializando os papéis da LDL e HDL (AUSTIN, 1999). A redução do colesterol total e o aumento dos níveis de HDL é reconhecidamente essencial para a prevenção de doenças cardiovasculares e doenças ateroscleróticas cardíacas (DURRINGTON, 2003), visto que o HDL realiza o transporte reverso do colesterol e têm propriedades antiinflamatórias e antioxidantes.

A tabela III mostra os valores de referência para diagnóstico das dislipidemias adotados no Brasil.

TABELA III – Valores de referência dos Lipídeos Plasmáticos adotados no Brasil segundo as III Diretrizes Brasileiras de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose.

Valores de referência dos lipídeos para indivíduos > 20 anos de idade em mmol/L		
Lipídeos	Valores	Categorias
CT	< 5,20	Ótimo
	5,20 - 6,20	Limitrofe
	≥ 6,24	Alto
LDL-C	< 2,60	Ótimo
	2,60 – 3,35	Desejável
	3,38 - 4,13	Limitrofe
	4,16 – 4,91	Alto
	≥ 4,94	Muito Alto
HDL-C	< 1,04	Baixo
	> 1,56	Alto
TG	< 1,69	Ótimo
	1,69 – 2,26	Limitrofe
	2,26 – 5,64	Alto
	≥ 5,65	Muito Alto

Fonte: Adaptado de III Diretrizes Brasileiras de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (SANTOS, *et al.*, 2001).

2.4 - ATEROSCLEROSE

Evidências clínicas, genéticas e epidemiológicas demonstram que a elevação da concentração plasmática de LDL, a principal lipoproteína transportadora de colesterol no plasma, constitui o maior fator de risco para a doença aterosclerótica (COOPER *et al.*, 2005). A captação da LDL-C pelas células através do receptor clássico de LDL não pode provocar um acúmulo apreciável de colesterol, porque o receptor está sujeito à inibição pelo conteúdo intracelular de colesterol. No entanto, formas modificadas de LDL, como a LDL acetilada ou LDL oxidada, são captadas através do mecanismo de reconhecimento pelo receptor *scavenger* (presente em macrófagos), resultando em um substancial acúmulo de colesterol e subsequente formação de células espumosas, uma vez que o receptor *scavenger* não é regulado pelo conteúdo celular de colesterol (CARMENA *et al.*, 2004; STOCKER e KEANEY-Jr, 2004; GOTTO, 2003; BROWN e GOLDSTEIN, 1983).

Vários estudos confirmaram o papel da LDL oxidada na aterogênese. Alguns oxidantes podem ser originários de células como os macrófagos, células endoteliais ou musculares lisas. Outros oxidantes podem ser originários de fontes exógenas como alimentos e cigarro. Assim, foi descrito que a oxidação da LDL pode ocorrer por mecanismos radicalares ou não. No entanto, o mecanismo predominante de quando, onde e como a oxidação da LDL ocorre *in vivo* ainda não foi estabelecido (NIKI, 2004). Alguns estudos sugerem que a oxidação da LDL ocorra principalmente na íntima arterial, em micro-compartimentos isentos de antioxidantes (STOCKER e KEANEY-Jr, 2004).

Na fase inicial do processo oxidativo, a oxidação da LDL resulta na formação de partículas de LDL minimamente modificadas no espaço subendotelial. Uma vez formada, a LDL modificada é capaz de induzir o endotélio a expressar moléculas de adesão para monócitos, secretando a proteína quimiotática para monócitos (MCP-1) e o fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF). Estes eventos resultam na adesão de monócitos circulantes ao endotélio, e subsequente migração para o espaço subendotelial, mediados pela MCP-1. No espaço subendotelial, a LDL modificada promove a diferenciação dos monócitos em macrófagos, via M-CSF. O macrófago, por

sua vez, oxida ainda mais a LDL minimamente modificada. Esta LDL oxidada pode então ser captada pelos macrófagos através do receptor *scavenger*, levando ao acúmulo de ésteres de colesterol (MULLENIX *et al.*, 2005; NIKI, 2004; GOTTO, 2003; BROWN e GOLDSTEIN, 1983)

A LDL oxidada tem efeito citotóxico inibindo a proliferação e motilidade espontâneas de células endoteliais de artéria coronária, esse efeito é proporcional à concentração e grau de oxidação da LDL (XAVIER *et al.*, 2004). Os produtos da oxidação da LDL, como óxidos de colesterol e lisofosfatidilcolina são citotóxicos. Essa citotoxicidade pode ser importante na indução da disfunção das células endoteliais e da conseqüente evolução da estria gordurosa para uma lesão mais avançada (MULLENIX *et al.*, 2005).

Todos esses eventos levam à formação da placa aterosclerótica. As placas podem ser divididas em estáveis ou instáveis.

As primeiras caracterizam-se por predomínio de colágeno, organizado com capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico menos proeminente. As últimas apresentam atividade inflamatória intensa, especialmente nos seus ângulos, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente e capa fibrótica tênue.

Tem sido sugerido que a ruptura das placas relaciona-se com as suas características morfológicas e bioquímicas, e não com seu grau de estenose (SILVA *et al.*, 2001). Ao longo da vida, pequenas rupturas ou trombozes parecem ocorrer, determinando remodelação das placas, freqüentemente sem manifestações clínicas. Todavia, o grau de trombose sobreposta à placa determinará a magnitude do evento cardiovascular (ZAMAN, 2000).

O papel da adventícia vem sendo revisto na aterogênese, a partir de observações histopatológicas, demonstrando a presença de células inflamatórias e de agentes infecciosos que poderiam migrar para o espaço intimal (SILVA *et al.*, 2001).

Embora qualquer artéria de médio e grande calibre possa ser afetada, os principais alvos da doença são, a aorta, as artérias coronárias e as cerebrais, diminuindo gradualmente o lúmen dos vasos impedindo a fluxo sanguíneo, tendo como principais conseqüências o aneurisma aórtico, infarto do miocárdio, a isquemia cerebral, respectivamente (STOCKER e KEANEY, 2004; ALVAREZ-LEITE *et al.*, 2003; LUSIS, 2000).

Este processo pode ser completamente insidioso durante décadas, até que este depósito se rompa, por causa de forças físicas do fluxo sanguíneo e componentes da parede arterial que são expostos ao fluxo sanguíneo, levando a trombose e ao comprometimento do suprimento de oxigênio para órgãos alvos como o coração e cérebro (STOCKER e KEANEY, 2004).

Estudos epidemiológicos sugerem que ao redor de 75% dos casos de enfermidade arterial coronariana (angina pectoris, infarto do miocárdio, morte súbita) são atribuíveis a fatores de risco. Esses fatores podem ser classificados em dois grandes grupos: não-modificáveis (idade, sexo, raça e genéticos) e os modificáveis pelo estilo de vida (obesidade, hipertensão arterial, tabagismo, vida sedentária e hábito alimentar) (SCOTT, 2004).

2.6 – MODELOS ANIMAIS NA PESQUISA DA ATEROSCLEROSE E SUA PREVENÇÃO

Para investigar a relação entre as disfunções do metabolismo do colesterol e a aterogênese, diversos modelos animais têm sido utilizados. Estes modelos têm sido de grande importância para a compreensão da etiologia da aterosclerose e para a descoberta de novos agentes terapêuticos.

Vários autores têm descrito a indução de dislipoproteinemias em animais de laboratório, que tem como vantagens: 1. a produção de lesões em um prazo de tempo relativamente curto; 2. controle adequado dos fatores dietéticos e ambientais; 3. possibilidade de estudar a reversibilidade dessas lesões; e 4. pode-se ter um ensaio pré-clínico dos medicamentos destinados a prevenção e tratamento da aterosclerose.

Existe uma série de vantagens em se usar pequenos animais em pesquisa, tais como baixo custo, que se deve à quantidade de ração consumida, menor espaço requerido para acomodação dos animais e facilidade de higienização. Muitas dietas usadas em pesquisa são preparadas com ingredientes purificados que são caros, mas em se tratando de pequenos animais, como o requerimento é pequeno, pode-se tornar menos oneroso. Os resultados podem ser obtidos com animais de laboratório em menor tempo do que com animais maiores. O pequeno animal tem pequeno ciclo reprodutivo e de

vida. O rato, por exemplo, vive menos que três anos, e dez dias na vida de um rato é aproximadamente a um ano de vida humana (ALEXANDER *et al.*, 1984).

O modelo experimental em roedores é o freqüentemente usado para avaliar os efeitos hipolipemiantes de muitos compostos naturais e sintéticos, contudo, nem todas as espécies apresentam o metabolismo lipoprotéico comparável ao de humanos.

Os coelhos foram o primeiro modelo animal usado na pesquisa para aterosclerose. Essas espécies partilham vários aspectos do metabolismo de lipoproteína com humanos, exceto pela deficiência de lipase hepática. Os coelhos desenvolvem placas ateroscleróticas avançadas, entretanto, são necessários níveis plasmáticos elevados de colesterol no plasma para que isso ocorra, o colesterol é absorvido eficientemente, e o seu alto nível no plasma pode ser induzido por dieta rica em gordura/colesterol. As dietas aterogênicas estão associadas com o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas no arco aórtico e na aorta torácica mais que na aorta abdominal a qual é afetada mais freqüentemente em humanos (MOGHADASIAN, 2002).

O rato é uma espécie resistente à aterosclerose. Diferente dos humanos e semelhante aos camundongos, os ratos não têm a proteína de transferência éster de colesterila (CETP) no plasma e a lipoproteína HDL é a principal carreadora de colesterol na circulação. Esses animais geralmente possuem hiporresposta para o colesterol dietético; então, hiperlipidemia e aterogênese podem ser induzidas em ratos somente por uma dieta rica em colesterol/gordura contendo ácido cólico e tiouracil. O ácido cólico aumenta a absorção de colesterol e concomitante suprime a atividade da colesterol 7α -hidroxilase (CYP-7 α) que resulta em menor excreção do colesterol. A tiouracil induz hipotiroidismo clínico com conseqüente diminuição da atividade do receptor para a LDL e hipercolesterolemia (MOGHADASIAN, 2002). Segundo MAHFOUZ e KUMMEROW (2000) os ratos são capazes de proteger o tecido hepático da oxidação e eliminar um possível aumento da peroxidação de lipídeos e oxisteróis. Isso indica que os ratos são menos sensíveis que outros animais utilizados em experimento, como o coelho, quanto aos efeitos aterogênicos de uma dieta hipercolesterolêmica.

Os hamsteres podem desenvolver hipercolesterolemia e aterosclerose em dietas aterogênicas. Uma dieta contendo 0,2% de colesterol e 10% de óleo de coco causa um aumento de 4 vezes o nível de colesterol no plasma e formação de camadas de gordura

na aorta ascendente de machos *Golden Syrian* por um período acima de 2 meses. A dieta aterogênica resulta em mais de 200% de aumento das lipoproteínas VLDL e IDL, um aumento de 20% na LDL e 45% de diminuição na concentração de HDL comparado ao controle. Essas observações sugerem uma diferença significativa na distribuição do colesterol das lipoproteínas e localização das lesões ateromatosas entre hamster e homem. Entretanto, uma dieta similar rica em gordura, causa aumento no peso corporal sem modificar o nível de lipídio sanguíneo e aterogênese em hamster fêmea *Golden Syrian*. Por outro lado, os machos desenvolvem hiperlipidemia e aterogênese sem alteração significativa no ganho de peso (MOGHADASIAN, 2002).

O hamster é proposto como a espécie ideal para o estudo do metabolismo lipídico, uma vez que é considerada mais próxima dos humanos quanto ao metabolismo de lipídios, lipoproteínas e ácidos biliares (SUCKLING *et al.*, 1991; SPADY e DIETSCHY, 1983). Quando comparado a outros modelos animais, os hamsteres possuem uma série de vantagens: 1) como em humanos, o principal transportador plasmático de colesterol é a LDL; 2) o gene do receptor de LDL de hamster foi isolado e caracterizado, mostrando forte similaridade com o gene humano; 3) as placas ateroscleróticas se desenvolvem principalmente no arco aórtico (SIMA *et al.*, 2001).

Diante das inúmeras vantagens da utilização de hamsteres em estudos de metabolismo lipídico e diante do reconhecimento da hipercolesterolemia e estresse oxidativo como fator de risco para doenças ateroscleróticas e diante da busca de substâncias que fossem eficazes na redução dos níveis de colesterol e de radicais livres objetivou-se investigar nestes animais hipercolesterolêmicos através da dieta, o efeito da infusão aquosa do urucum e da torta de bixina no perfil lipídico, hepático e renal. Dessa forma, esse trabalho busca acrescentar à literatura dados sobre o efeito da infusão aquosa do urucum e da torta de bixina sobre o perfil sérico de lipídeos, defesas antioxidantes e marcadores séricos de função hepática e renal em hamsteres.

OBJETIVOS

CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da administração da infusão aquosa do urucum e o efeito da torta de bixina em hamsteres tratados com dietas padrão e hipercolesterolemiantes, e verificar o efeito sobre perfil sérico de lipídeos e defesas antioxidantes e a segurança de utilização analisando a função hepática, função renal e outros metabólitos.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

➤ Em hamsteres submetidos a dieta padrão ou hipercolesterolemiantes acrescidas ou não com a torta de bixina, avaliar os efeitos de extratos de urucum sobre:

- 1- Perfil sérico e hepático de lipídeos;
- 2- Perfil sérico de defesas antioxidantes: atividade da catalase, paraoxonase e sulfidrilas protéicas e de baixo peso molecular;
- 3- Função hepática e renal através de marcadores bioquímicos séricos: AST, ALT, ALP, uréia e creatinina.

MATERIAL E MÉTODOS



CAPÍTULO 4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - ANIMAIS

Foram utilizados hamsteres (*Mesocricetus auratus*) da raça *Golden Syrian*, machos, com idades entre 100 – 120 dias e peso médio de 100g, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição (ENUT) da Universidade Federal de Ouro Preto. Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais dispostas em ambiente com temperatura, luminosidade e umidade controladas e receberam água “*ad libitum*”.

4.2 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em 8 grupos sendo cada grupo composto por 8 animais. No grupo I, os animais receberam dieta padrão (C), no grupo II, os animais receberam dieta hipercolesterolemiantes (H), no grupo III eles receberam dieta padrão mais infusão aquosa de urucum (CCh), no grupo IV os animais receberam dieta hipercolesterolemiantes mais infusão aquosa de urucum (HCh), no grupo V os animais receberam dieta padrão contendo 0,015% de torta de bixina (CB15) , no grupo VI os animais receberam dieta hipercolesterolemiantes contendo 0,015% de torta de bixina (HB15); no grupo VII os animais receberam dieta padrão contendo 0,075% de torta de bixina (CB75) e no grupo VIII, os animais receberam dieta hipercolesterolemiantes contendo 0,075% de torta de bixina (HB75) (Tabela IV).

Os animais passaram por um período de adaptação às respectivas dietas por 15 dias e, então, tiveram o peso inicial determinado. Ao fim deste período contaram-se mais seis semanas e, então, realizou-se o sacrifício dos animais. Foram medidas semanalmente a ingestão alimentar, o desperdício e a quantidade de fezes.

4.3 – DIETAS

Os animais foram alimentados com dietas padrão e hipercolesterolemiantes e dietas padrão e hipercolesterolemiantes contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina preparadas no Laboratório de Nutrição Experimental (Labnex), da ENUT, UFOP, conforme tabela IV, seguindo recomendações nutricionais da AIN-93 M (REEVES *et al.*, 1993). A torta de bixina utilizada neste trabalho é o pigmento extraído do pericarpo da semente do urucum e posteriormente é prensado. Foi gentilmente cedida pela empresa *Corantec - Corantes Naturais Ltda.* Para fazer a infusão aquosa, utilizou-se seis gramas da semente de urucum seca que foram colocadas em contato com um litro de água durante 24 horas para depois ser usado. A infusão sempre era preparada no dia anterior ao dia de consumo.

TABELA IV – Composição das dietas padrão e hipercolesterolêmicas em gramas para cada 1000g de dieta.

	C	H	CCh	HCh
Caseína	140,0	140,0	140,0	140,0
Amido Milho	722,5	587,5	722,5	587,5
Óleo	40,0	170,0	40,0	170,0
Colesterol	0,0	5,0	0,0	5,0
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Mist. Minerais ¹	35,0	35,0	35,0	35,0
Mist. Vitaminas ²	10,0	10,0	10,0	10,0
Fibra	50,0	50,0	50,0	50,0
Torta de Bixina	0,0	0,0	0,0	0,0

	CB15	HB15	CB75	HB75
Caseína	140,0	140,0	140,0	140,0
Amido Milho	722,35	587,35	721,75	586,75
Óleo	40,0	170,0	40,0	170,0
Colesterol	0,0	5,0	0,0	5,0
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Mist. Minerais ¹	35,0	35,0	35,0	35,0
Mist. Vitaminas ²	10,0	10,0	10,0	10,0
Fibra	50,0	50,0	50,0	50,0
Torta de Bixina	0,15	0,15	0,75	0,75

¹Mistura de minerais (g/Kg de mistura): NaCl – 139,3 / KI – 0,79 / MgSO₄.7H₂O – 57,3 / CaCO₃ – 381,4 / MnSO₄.H₂O – 4,01 / FeSO₄.7H₂O – 27,0 / ZnSO₄.7H₂O – 0,548 / CuSO₄.5H₂O – 0,477 / CoCl₂.6H₂O – 0,023 / KH₂PO₄ – 389,0.

²Mistura de vitaminas (g/Kg de mistura): Acetato de retinol – 2.000.000IU / Colecalciferol – 200.000IU / Ácido p-aminobenzóico – 10,00 / I-Inositol – 10,00 / Niacina – 4,00 / Pantotenato de cálcio – 4,00 / Riboflavina – 0,80 / Tiamina HCl – 0,50 / Piridoxina HCl – 0,50 / Ácido fólico – 0,20 / Biotina – 0,04 / Vitamina B12 – 0,003 / Sacarose – q.s.p. 1000. / Colina – 200,0 / α -Tocoferol – 10.000IU.

4.4 - DOSAGENS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os animais foram deixados 8 horas em jejum, anestesiados com éter, sacrificados, e o sangue foi coletado através do plexo braquial e colocados em tubos *ependorf*. Um tubo continha anticoagulante para obtenção do plasma e o outro não continha anticoagulante para a obtenção do soro após a centrifugação dos mesmos. Posteriormente o sangue foi centrifugado a 16000 x g por 15 minutos para obtenção do soro ou plasma que foi guardado sob refrigeração (-4°C).

Os níveis séricos de colesterol total, colesterol HDL, triacilgliceróis, glicose, hemoglobina, uréia, proteínas totais, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), creatinina, radical sulfidrila total, radical sulfidrila livre, catalase, paraoxonase, gordura no fígado e fezes e colesterol total e triacilgliceróis na gordura do fígado e fezes foram dosados e calculados radical sulfidrila ligados à proteína e o colesterol não HDL.

Foram feitas medições do peso inicial, do peso final, da ingestão alimentar/semana, do ganho de peso/semana, além de retirados e pesados os órgãos como o fígado, baço, coração e rins. Os fígados e as fezes dos animais foram congelados a 2 °C para posterior dosagem de gordura no fígado.

Todas as dosagens foram realizadas em até quatro dias utilizando kits comerciais Labtest Diagnóstica S.A., cujos princípios e protocolos das análises encontram-se descritos a seguir:

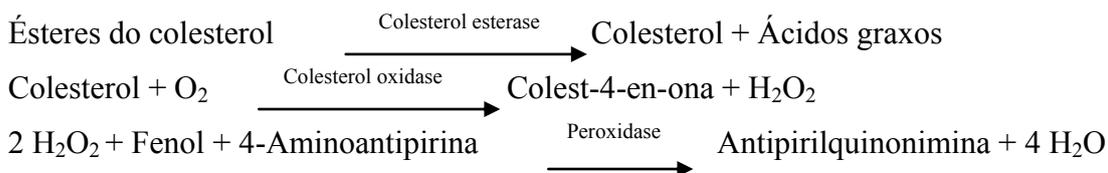
Para a garantia do controle de qualidade das determinações bioquímicas foi utilizado o soro Qualitrol 1H da Labtest Diagnóstica S.A.

4.4.1 - DOSAGEM DO COLESTEROL TOTAL

Esta dosagem foi realizada utilizando Kit Comercial Labtest (Cat 76 ANVISA 10009010068), pelo método Enzimático – Trinder.

➤ PRINCÍPIO DA TÉCNICA

O colesterol total é determinado de acordo com as seguintes reações:



Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. A colesterol oxidase oxida o colesterol livre a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4 aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina que tem absorvidade máxima em 500nm. O kit fornece o reagente de cor, o tampão e o padrão de colesterol com concentração de 200 mg/dL.

A intensidade da cor formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Foi utilizado 10 µL de soro e 1000 µL de reagente de cor para cada teste e foi realizado um padrão da mesma forma. As amostras dos testes e do padrão foram colocados em banho-maria a 37° C por 10 minutos. As leituras foram feitas em

espectrofotômetro a 500 nm. Para se determinar a concentração de colesterol do teste, a absorbância do teste era dividida pela absorbância do padrão e multiplicada pela concentração do padrão. Os valores obtidos em unidades convencionais (mg/dL) foram multiplicados por 0,026 para transformá-los em unidades internacionais (mmol/L).

4.4.3 - DOSAGEM DO COLESTEROL HDL

Esta dosagem foi realizada utilizando Kit Comercial Labtest (Cat 13 ANVISA 10009010026).

➤ PRINCÍPIO DA TÉCNICA

As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativa e seletivamente precipitadas pelo precipitante do kit que utiliza o ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. O soro é centrifugado, após a centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (colesterol HDL) é determinado no sobrenadante. O kit fornece o precipitante e o padrão de colesterol HDL com concentração de 20 mg/dL.

➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Foi utilizado 125 µL de soro ao qual foi acrescentado 125 µL de precipitante em seguida foi agitado no vórtex por 30 segundos vigorosamente e centrifugados por 15 minutos a 16000 x g para se obter o sobrenadante límpido. No sobrenadante foi dosado o colesterol como no método para colesterol total.

Os valores obtidos em unidades convencionais (mg/dL) foram multiplicados por 0,026 para transformá-los em unidades internacionais (mmol/L).

4.4.4 - DETERMINAÇÕES DOS NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL NÃO HDL

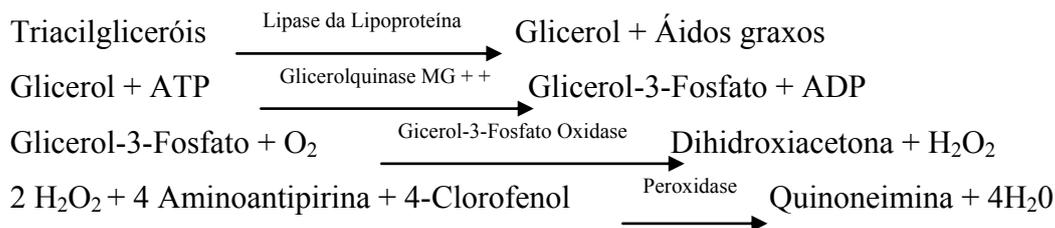
Para a determinação da concentração do colesterol não HDL foi feita a subtração da concentração do colesterol total da concentração do colesterol HDL.

4.4.5 - DOSAGEM DE TRIACILGLICERÓIS

Esta dosagem foi realizada utilizando Kit Comercial Labtest (Cat 87 ANVISA 10009010070) pelo método Enzimático – Trinder.

➤ PRINCÍPIO DA TÉCNICA

Os triacilgliceróis são determinados de acordo com as seguintes reações:



Na hidrólise dos triacilgliceróis, catalisada pela lipase da lipoproteína, o glicerol liberado é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato. Na presença da glicerolfosfato oxidase, o glicerol-3-fosfato, é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. A reação de acoplamento que ocorre entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e ESPAS (N-etil N-sufopropil n-anizidine) é catalisada pela peroxidase produzindo a quinoneimina que tem máximo de absorbância em 540nm. O kit fornece um padrão com concentração de 200 mg/dL.

A intensidade de cor violeta formada é diretamente proporcional à concentração dos triacilgliceróis na amostra.

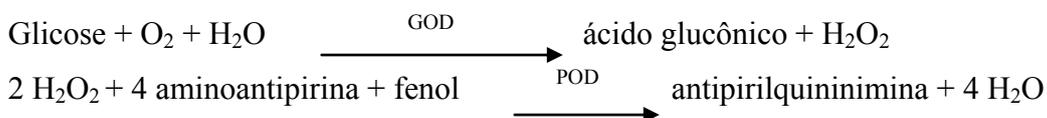
➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Foi utilizado 10 µL de amostra (testes) e 1000 µL de reagente de cor para cada teste, foi realizado também um padrão da mesma forma. As amostras e o padrão foram deixados a 37°C em banho-maria por 10 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Para determinar a concentração de triacilgliceróis do teste, a absorbância do teste era dividida pela absorbância do padrão e multiplicada pela concentração do padrão. Os valores obtidos em unidades convencionais (mg/dL) foram multiplicados por 0,0113 para transformá-los em unidades internacionais (mmol/L).

4.4.6 - DOSAGEM DE GLICOSE

Esta dosagem foi realizada utilizando Kit Comercial Labtest (Cat 84 ANVISA 1009010003), pelo método cinético ou de ponto final – Trinder.

➤ PRINCÍPIO DA TÉCNICA



A oxidação da glicose através da glicose oxidase (GOD) é catalisa a ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Este através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando uma antipirilquinonimina de cor vermelha, cuja absorbância medida em 505 nm, é proporcional à concentração de glicose na amostra. O kit fornece um padrão de glicose com concentração de 100 mg/dL

➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Foi utilizado 10 µL de amostra e 1000 µL de reagente para cada teste, foi realizado também um padrão da mesma forma. Foi incubado a banho-maria a 37°C por 15 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 505 nm. Para se obter a concentração de glicose nas amostras, foi dividida a absorbância do teste pela

absorbância do padrão e multiplicada pela concentração do padrão. Os valores obtidos em unidades convencionais (mg/dL) foram multiplicados por 0,0556 para transformá-los em unidades internacionais (mmol/L).

4.4.7 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

Esta dosagem foi realizada utilizando Kit Comercial Labtest (Cat 99 ANVISA 10009010080).

➤ PRINCÍPIO DA TÉCNICA

As ligações peptídicas das proteínas do soro (-HN-CO-) reagem com íons cúpricos em meio alcalino (Reagente de Biureto) formando um complexo de coloração púrpura que é diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra. O kit fornece um padrão com concentração de 4,0 g/dL.

➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Foi colocado 12,5 µL de soro em um tubo de ensaio ao qual foi adicionado 625 µL do reagente de biureto de uso (tubos teste), para o tubo do padrão foram adicionados 12,5 µL de padrão (4 g/dL) e para o tubo do branco 12,5 µL de água destilada. Homogeneizou-se os tubos e após 15 minutos à temperatura ambiente, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 545 nm. Para se obter a concentração de proteínas totais nas amostras, foi dividida a absorbância do teste pela absorbância do padrão e multiplicada pela concentração do padrão. Os valores obtidos em unidades convencionais (g/dL) foram multiplicados por 10 para transformá-los em unidades internacionais (g/L).

4.4.8 - DOSAGEM DE ALBUMINA

Esta dosagem foi realizada utilizando Kit Comercial Labtest (Cat 19 ANVISA 10009010025) pelo método Verde de Bromocresol.

➤ PRINCÍPIO DA TÉCNICA

A albumina possui a propriedade de se ligar a certos corantes e a uma grande variedade de ânions, que mudam de cor em meio tamponado quando ligados a ela.

O verde de bromocresol que em pH 3,8 apresenta cor amarela adquire cor verde quando se liga a albumina. O sistema de medição baseia-se no desvio do pico de absorvidade máxima do verde de bromocresol contido no reagente. A absorbância do complexo formado é diretamente proporcional à concentração da albumina na amostra analisada. O kit fornece um padrão de albumina na concentração de 3,8 g/dL.

➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Foi utilizado 10 μ L de soro para os tubos teste aos quais foram adicionados 1000 μ L de reagente de cor. Foi feito também um padrão utilizando-se 10 μ L de padrão. Após homogeneizar e aguardar 2 minutos, e no máximo em 10 minutos, fez-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro à 630 nm. Para se obter a concentração de albumina nas amostras foi dividida a absorbância do teste pela absorbância do padrão e multiplicada pela concentração do padrão. Os valores obtidos em unidades convencionais (g/dL) foram multiplicados por 144,9 para transformá-los em unidades internacionais (μ mol/L).

4.4.9 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA (ALP)

Esta dosagem foi realizada utilizando Kit Comercial Labtest (Cat 40 ANVISA 10009010081), pelo método Roy modificado.

➤ PRINCÍPIO DA TÉCNICA

A fosfatase alcalina do soro hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína, que tem cor azul em meio alcalino. A cor formada, diretamente proporcional à atividade enzimática, é medida em 590 nm. O produto final da reação se constitui de uma mistura de cor azul e a cor própria do substrato. O kit fornece um padrão de fosfatase alcalina de 45 U/L.

➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Utilizaram-se 25 µL de substrato e tampão para o teste, o branco e o padrão e ainda, para o padrão adicionaram-se 25 µL de reagente padrão. Colocou-se em banho-maria a 37° C durante 2 minutos. Os tubos foram removidos do banho-maria para que fosse adicionado a amostra. Adicionou-se 25 µL de soro ao teste, homogeneizou-se e incubou em banho-maria por mais 10 minutos (cronometrados). Em seguida adicionou-se 1,0 mL do reagente de cor e, determinou-se a absorbância em espectrofotômetro a 590 nm. Para se obter a atividade da fosfatase alcalina nas amostras foi dividida a absorbância do teste pela absorbância do padrão e multiplicada pela concentração do padrão.

4.4.10 - DOSAGEM DE URÉIA

Esta dosagem foi realizada utilizando Kit Comercial Labtest (Cat 27 ANVISA 10009010011).

➤ PRINCÍPIO DA TÉCNICA

A uréia é hidrolisada pela urease a íons amonium e CO₂. Em meio alcalino, os íons amonium reagem com salicinato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar azul de indofenol. A absorbância do complexo azul

formado é diretamente proporcional à concentração de uréia na amostra. O kit fornece um padrão de 70 mg/dL.

➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Para a realização da dosagem foram realizados alguns procedimentos anteriores como:

Preparação do tampão de uso – o Kit contém tampão fosfato (100 mmol/L), pH 6,9, que foi adicionado a 400 mL de água destilada;

Preparação do oxidante de uso – o kit contém hidróxido de sódio 2,8 mol/L e hipoclorito de sódio 121 mmol/L, que foi adicionado a 475 mL de água destilada;

Preparação da urease tamponada – o kit contém tampão fosfato (10 mmol/L) e urease ≥ 268 KU/L, adicionou-se 1,0 mL de urease a 20 mL do tampão de uso.

Foi utilizado 10 μ L de soro para os tubos teste aos quais foram adicionados 1000 μ L de urease tamponada, e para o padrão foi adicionado 1000 μ L de urease tamponada e 10 μ L de padrão de uréia (70 mg/dL). Após este procedimento foram incubados a 37°C por 5 minutos. Depois todos os tubos receberam 1000 μ L de oxidante de uso. Foram incubados a 37°C por 5 minutos. O branco continha 1000 μ L de solução de uréia tamponada e 1000 μ L de solução de oxidante de uso. As absorbâncias foram determinadas com espectrofotômetro a 600 nm.

Para se obter a concentração de uréia nas amostras foi dividida a absorbância do teste pela absorbância do padrão e multiplicada pela concentração do padrão. Os valores obtidos em unidades convencionais (mg/dL) foram multiplicados por 0,166 para transformá-los em unidades internacionais (mmol/L).

4.4.11 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)

Esta dosagem foi realizada utilizando Kit Comercial Labtest (Cat 52 ANVISA 10009010031).

➤ PRINCÍPIO DA TÉCNICA

A aspartato aminotransaminase catalisa a transferência de grupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos.



O oxalacetato formado reage com a 2 – 4 difenilhidrazona formando a hidrazona que adquire coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade de coloração é proporcional à atividade enzimática da amostra. A determinação da atividade da enzima é realizada pelo método cinético de tempo fixo e medição de ponto final – Reitman e Frankel. O kit fornece um padrão que contém piruvato de sódio com concentração de 2,0 mmol/L que é utilizado para a obtenção da curva de calibração.

A curva de calibração foi realizada como se segue:

Tubo nº	1	2	3	4	5
Padrão	—	0,05 mL	0,1 ml	0,15 mL	0,2 mL
AST substrato	0,5 mL	0,45 mL	0,4 mL	0,35 mL	0,3 mL
Água destilada	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
Reagente de cor	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL

Foi feita a homogeneização dos tubos e deixados a temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse tempo foi adicionado a cada tubo 5000 μ L de NaOH de uso. Foi feita a homogeneização dos tubos e deixados a temperatura ambiente por 5 minutos. As absorbâncias foram determinadas com espectrofotômetro a 505 nm.

A curva de calibração foi obtida correlacionando as leituras obtidas com os valores em unidades/mL, expressos na tabela abaixo e fornecida pelo fabricante:

Tubo nº	1	2	3	4	5
AST (unidades/mL)	Zero	24	61	114	190

Preparação do NaOH de uso – o kit contém hidróxido de sódio 1,25 mol/L ao qual foi adicionado 500 mL de água destilada.

➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Retirou-se 50 µL do substrato enzimático aspartato aminotransferase que foi colocado em banho-maria a 37°C por 2 minutos. No mesmo tubo colocou-se 10 µL da amostra que após ser homogeneizado foi incubado em banho-maria a 37 °C por exatamente 60 minutos. Adicionou-se 50 µL do reagente de cor para interromper a reação, homogeneizou-se e deixou-se em temperatura ambiente por 20 minutos. Colocou-se 500 µL de NaOH de uso, homogeneizado e após 5 minutos, feita a leitura em espectrofotômetro à 505nm.

4.4.12 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT)

Esta dosagem foi realizada utilizando Kit Comercial Labtest (Cat 53 ANVISA 10009010027).

➤ PRINCÍPIO DA TÉCNICA

A alanina aminotransferase catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o α -cetoglutarato com formação do glutamato e piruvato.



O piruvato formado reage com 2 – 4 difenilhidrazona formando a hidrazona que adquire coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade da coloração é proporcional à atividade enzimática da amostra. A determinação da atividade da enzima é realizada pelo método cinético de tempo fixo e medição de ponto final – Reitman e Frankel. O kit fornece um padrão que contém piruvato de sódio com concentração de 2,0 mmol/L que é utilizado para a obtenção da curva de calibração.

A curva de calibração foi realizada como se segue:

Tubo nº	1	2	3	4	5
Padrão	—	0,05 mL	0,1 ml	0,15 mL	0,2 mL
ALT substrato	0,5 mL	0,45 mL	0,4 mL	0,35 mL	0,3 mL
Água destilada	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
Reagente de cor	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL

Foi feita a homogeneização dos tubos e deixados a temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse tempo foi adicionado a cada tubo 5000 μL de NaOH de uso. Foi feita a homogeneização dos tubos e deixados a temperatura ambiente por 5 minutos. As absorvâncias foram determinadas com espectrofotômetro a 505 nm.

A curva de calibração foi obtida correlacionando as leituras obtidas com os valores em unidades/mL, expressos na tabela abaixo e fornecida pelo fabricante:

Tubo nº	1	2	3	4	5
ALT (unidades/mL)	Zero	28	57	97	150

➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Retirou-se 75 μL do substrato enzimático alanina aminotransferase que foi colocado em banho-maria a 37°C por 2 minutos. No mesmo tubo colocou-se 12,5 μL da amostra que após ser homogeneizado foi incubado em banho-maria a 37 °C por exatamente 30 minutos. Adicionou-se 75 μL do reagente de cor para interromper a reação, homogeneizou-se e deixou-se em temperatura ambiente por 20 minutos. Colocou-se 750 μL de NaOH de uso, homogeneizado e após 5 minutos, feita a leitura em espectrofotômetro à 505nm.

4.4.13 - DOSAGEM DE SULFIDRILAS TOTAIS, LIVRES E LIGADAS À PROTEÍNAS

➤ PRINCÍPIO DA TÉCNICA

Foi utilizado o método de Ellman para a execução destas técnicas (HOENICKA, 1999). Este método baseia-se na reação de grupos tióis com o ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitro-benzóico (DTNB – Reagente de Ellman) formando um ânion amarelo do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico que é medido espectrofotometricamente a 412 nm.

Foi feita uma curva de calibração padrão nas seguintes concentrações: 0; 25; 50; 100; 150; 250; 500; 1000 $\mu\text{mol/L}$, para o SH livre e para o SH total utilizando glutatona de estoque (20 mM) que foi diluída em trietanolamina-HCl (TEA).

➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Para a determinação das sulfidrilas totais presentes no soro e para a montagem da curva de calibração foram adicionados em um tubo 40 µL de amostra ou da solução padrão, 150 µL de tampão Tris-HCl pH 8,2; 50 µL de DTNB e; 800 µL de metanol. Os tubos foram centrifugados a 3000 x g por 5 minutos a 25° C e a absorbância lida em 412 nm.

Para a determinação das sulfidrilas livres presentes no soro, as proteínas foram precipitadas utilizando ácido tricloroacético (TCA) 10%, sendo utilizado o sobrenadante para a dosagem. Assim, 200 µL de amostra foram adicionadas a mesmo volume de TCA e centrifugado 16000 x g por 15 minutos. Após este procedimento, foram adicionados 600 µL de tampão Tris-HCl pH 8,9 e 60 µL de DTNB a 150 µL de sobrenadante da precipitação com DTNB. A absorbância foi lida em 412 nm.

A determinação das sulfidrilas ligadas às proteínas foi calculada pela diferença entre as sulfidrilas totais e as sulfidrilas livres. Todas as concentrações são obtidas em µmol/L.

4.4.14 - DOSAGEM DE HEMOGLOBINA

Esta dosagem foi realizada utilizando Kit Comercial Labtest (Cat 43).

➤ PRINCÍPIO DA TÉCNICA

O ferro ferroso (Fe II), do grupo heme da hemoglobina, oxihemoglobina e carboxihemoglobina é oxidado ao estado férrico (Fe III) pelo ferricianeto, contido no reagente de cor fornecido pelo Kit, formando hemiglobina (Hi) combinando-se com o cianeto ionizado, também contido no reagente de cor, produzindo assim o cianeto de hemiglobina (HiCN), o qual absorve luz a 540 nm.

➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Foi utilizado 10 µL de sangue para os tubos testes aos quais foram acrescentados 2500 µL de reagente de cor. Para o padrão foram misturados 2500 µL de reagente de cor a 10 µL de padrão (10 g/dL) de hemoglobina. Os tubos foram homogeneizados e após 5 minutos as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 540 nm. Para se obter a concentração de hemoglobina na amostra, a absorbância da amostra foi dividida pela absorbância do padrão e multiplicada pela concentração do padrão. Os valores obtidos em unidades convencionais (g/dL) foram multiplicados por 1,61 para transformá-los em unidades internacionais (µmol/L).

4.4.15 - DOSAGEM DE PARAOXONASE (PON) – ATIVIDADE ARILESTERASE

➤ PRINCÍPIO DA TÉCNICA

A atividade arilesterase da paraoxonase foi determinada como previamente descrito por Beltowski J. *et al.*, em 2002, tendo como base a velocidade de hidrólise do fenilacetato. Uma solução contendo 1 µL de fenilacetato e 1500 µL de Tris HCl 9 mM pH 8 foi preparada, dessa solução foram retirados 0,5 mL e misturados com 2 mL de Tris HCl 9 mM pH 8 contendo CaCl₂ 0,9 mM.

➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Foram colocados 5 µL de soro e a absorbância a 270 nm foi lida em 3 minutos exatamente. O branco usado para zerar o aparelho, foi preparado como descrito acima, porém sem soro e a absorbância obtida foi subtraída das absorbâncias de cada amostra. Foi usado o coeficiente de extinção molar, do fenilacetato, 1.310 (M⁻¹ cm⁻¹) e os resultados foram expressos em U/mL onde uma unidade (U) de arilesterase hidroliza 1 mmol de fenilacetato por minuto.

4.4.16 - DOSAGEM DE CREATININA

Esta dosagem foi realizada utilizando Kit Comercial Labtest (Cat 35 ANVISA 10009010034).

➤ PRINCÍPIO DA TÉCNICA

A creatinina e outros componentes do soro reagem com a solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente.

A decomposição do picrato de creatinina é promovida através da adição de um acidificante que abaixa o pH para 5,0, fazendo com que a cor derivada dos cromogênios permaneça inalterada, sendo também medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina verdadeira. O kit fornece um padrão de creatinina na concentração de 4,0 mg/dL.

➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Utilizou-se 1000 μ L do tampão, 125 μ L da amostra, e 250 μ L de ácido pícrico para os tubos teste. Para o branco utilizou-se 1000 μ L do tampão 125 μ L de água destilada e 250 μ L de ácido pícrico. Para o padrão utilizou-se 1000 μ L do tampão, 125 μ L do padrão e 250 μ L de ácido pícrico. Após homogeneizar e incubar em banho-maria à 37° C por 10 minutos, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 510 nm determinando-se a absorbância A_1 . Adicionou-se 50 μ L de acidificante aos tubos teste e ao branco e após 5 minutos em temperatura ambiente, determinou-se a absorbância A_2 em espectrofotômetro a 510 nm.

Para se obter a concentração de creatinina nas amostras, foi subtraída a absorbância A_1 da absorbância A_2 , dividida pela absorbância do padrão e multiplicada pela concentração do padrão. Os valores obtidos em unidades convencionais (mg/dL) foram multiplicados por 88,4 para transformá-los em unidades internacionais (μ mol/L).

4.4.17 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DA CATALASE

➤ PRINCÍPIO DA TÉCNICA

A atividade da catalase foi determinada baseado na sua capacidade de hidrolisar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular.

➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Em um tubo de ensaio colocou-se 900 µL de H₂O₂ 10 mM, 50 µL de tampão fosfato pH 7,2, 40 µL de H₂O destilada e 10 µL do soro. Homogeneizou-se a solução, zerou-se o espectrofotômetro a 240 nm e determinou-se as absorvâncias a cada minuto, durante cinco minutos. Foi usado o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ 39,4 M⁻¹ cm⁻¹. Os resultados foram expressos em U/L (onde 1 U da enzima hidrolisa 1 µmol de H₂O₂ por minuto).

4.4.18 - DOSAGEM DE GORDURA NO FÍGADO

As amostras dos fígados dos animais foram previamente secas em estufa ventilada. Após este procedimento os fígados foram triturados e embalados em cartuchos papel de filtro e estes mergulhados em éter, no aparelho de extração (Sohxlet) e deixados por 8 horas sob refluxo. Posteriormente, os cartuchos de papel foram retirados e o éter evaporado. O balão, que continha a gordura extraída das amostras, foi colocado em uma estufa por 1 hora e 30 minutos e depois colocado no dessecador por 40 minutos e após total resfriamento a porcentagem de gordura foi determinada pela fórmula abaixo:

$$\% \text{ gordura} = \frac{100 \times D}{A}$$

A

D = Peso do balão contendo a gordura extraída menos o peso do balão vazio.

A = Peso da amostra.

4.4.20 - DOSAGEM DE GORDURA NAS FEZES

As amostras dos fígados dos animais foram previamente secas em estufa ventilada. Após este procedimento as fezes foram trituradas e embaladas em cartuchos papel de filtro e estes mergulhados em éter, no aparelho de extração (Sohxlet) e deixados por 5 horas sob refluxo. Posteriormente, os cartuchos de papel filtro foram retirados e o éter evaporado. O balão, que continha a gordura extraída das amostras, foi colocado em uma estufa por 1 hora e 30 minutos e depois colocado no dessecador por 40 minutos e após total resfriamento a porcentagem de gordura foi determinada pela fórmula abaixo:

$$\% \text{ gordura} = \frac{100 \times D}{A}$$

D = Peso do balão contendo a gordura extraída menos o peso do balão vazio.

A = Peso da amostra.

4.4.21 – DOSAGEM DE COLESTEROL TOTAL NA GORDURA DO FÍGADO

➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Para executar essa dosagem foi utilizada 20 µL de gordura extraída do fígado que foi posteriormente diluída em 1000 µL de isopropanol. Após homogeneização, foi realizada a dosagem do colesterol total de acordo com protocolo descrito no item 4.4.1.

4.4.22 – DOSAGEM DE TRIACILGLICERÓIS NA GORDURA DO FÍGADO

➤ EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Para executar essa dosagem foi utilizada 20 µL de gordura extraída do fígado que foi posteriormente diluída em 500 µL de isopropanol. Após homogeneização, foi realizada a dosagem do colesterol total de acordo com protocolo descrito no item 4.4.5.

4.4.23 - AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

O peso corporal, a ingestão da dieta, o desperdício da dieta e as fezes foram acompanhados semanalmente. Valores totais (em seis semanas) do ganho de peso, a ingestão, o desperdício e fezes foram determinados.

4.4.24 - PESO DO FÍGADO, BAÇO E CORAÇÃO

Após os animais terem sido anestesiados e o sangue recolhido em tubos de *eppendorf*, o fígado, o baço, o coração e os rins foram extraídos e posteriormente pesados.

4.4.25 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância bivariada (*two-way* ANOVA) foi utilizada para testar a diferença significativa entre os efeitos da dieta padrão e dieta hipercolesterolemiantes com as demais dietas utilizadas. Foi utilizado o programa de computador MINITAB STATISTICAL SOFTWARE 13.31. As diferenças foram consideradas significantes quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05. Quando houve interação entre os fatores ($p \leq 0,05$), foi realizado o Teste de Tukey.

Usou-se o teste de Tukey, o qual faz contrastes não ortogonais de comparação entre duas médias e permite estabelecer a diferença mínima significativa, ou seja, a menor diferença de médias de amostras que deve ser tomada como estatisticamente significativa em determinado nível. Os resultados estão expressos com média \pm desvio padrão.

RESULTADOS



CAPÍTULO 5 - RESULTADOS

A tabela V mostra os valores dos resultados do perfil lipídico dos animais. Todos esses parâmetros apresentaram interação entre dieta e tratamentos utilizados. Com relação aos níveis de colesterol total os grupos que receberam dietas HB15 ($6,22 \pm 0,6$ mmol/L) e HB75 ($6,39 \pm 0,96$ mmol/L) apresentaram maiores valores de colesterol total, seguidos pelos grupos H ($4,23 \pm 0,54$ mmol/L) e HCh ($4,89 \pm 0,59$ mmol/L) que tiveram valores estatisticamente semelhantes e pelos grupos C ($2,93 \pm 0,86$ mmol/L), CCh ($2,74 \pm 0,86$ mmol/L), CB15 ($2,23 \pm 0,39$ mmol/L) e CB75 ($2,61 \pm 0,37$ mmol/L) os quais também obtiveram valores estatisticamente semelhantes. Concluindo, observamos que associado à dieta padrão os tratamentos não alteraram a colesterolemia, mas, surpreendentemente, observamos aumento do colesterol sérico quando os tratamentos foram associados à dieta hipercolesterolemia. O mesmo foi observado para a fração HDL e não HDL do colesterol.

Com relação ao colesterol HDL os grupos que receberam dietas HB15 ($2,9 \pm 0,38$ mmol/L) e HB75 ($3,2 \pm 0,17$ mmol/L) apresentaram os maiores valores de colesterol HDL, seguidos pelos grupos H ($2,17 \pm 0,38$ mmol/L) e HCh ($2,17 \pm 0,34$ mmol/L) que tiveram valores estatisticamente semelhantes e pelos grupos C ($1,52 \pm 0,55$ mmol/L), CCh ($1,08 \pm 0,21$ mmol/L), CB15 ($1,32 \pm 0,23$ mmol/L) e CB75 ($1,37 \pm 0,15$ mmol/L) os quais obtiveram valores estatisticamente semelhantes.

Para os níveis de colesterol não-HDL os grupos que receberam dietas HB15 ($3,32 \pm 0,81$ mmol/L) e HB75 ($3,19 \pm 1,09$ mmol/L) apresentaram valores semelhantes entre si. Os grupos C ($1,41 \pm 0,42$ mmol/L), H ($2,07 \pm 0,67$ mmol/L), CCh ($1,66 \pm 0,94$ mmol/L), CB15 ($0,91 \pm 0,33$ mmol/L) e CB75 ($1,24 \pm 0,37$ mmol/L) apresentaram valores de colesterol não-HDL estatisticamente semelhantes. O grupo HCh ($2,73 \pm 0,86$ mmol/L) apresentou valores semelhantes aos demais grupos.

Com relação aos triacilgliceróis, os grupos que apresentaram os maiores valores foram os que receberam dietas C ($2,31 \pm 0,51$ mmol/L) e CCh ($3,02 \pm 0,54$ mmol/L). Os grupos H ($1,3 \pm 0,7$ mmol/L), HCh ($1,38 \pm 0,65$ mmol/L), CB15 ($1,62 \pm 0,33$ mmol/L), HB15 ($1,5 \pm 0,47$ mmol/L) e CB75 ($1,99 \pm 0,54$ mmol/L) apresentaram valores

estatisticamente semelhantes e o grupo HB75 ($0,99 \pm 0,49$ mmol/L) apresentou os menores valores de triacilgliceróis. Não foram encontrados efeitos importantes para os triacilgliceróis.

TABELA V – Níveis séricos de colesterol total (CT), colesterol HDL, triacilgliceróis (TG) e colesterol não HDL de animais alimentados com dieta padrão (C), hipercolesterolemiante (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75).

	CT (mmol/L)	HDL (mmol/L)	Colesterol não HDL (mmol/L)	TG (mmol/L)
C	$2,93 \pm 0,86^c$	$1,52 \pm 0,55^c$	$1,41 \pm 0,42^b$	$2,31 \pm 0,51^a$
H	$4,23 \pm 0,54^b$	$2,17 \pm 0,38^b$	$2,07 \pm 0,67^b$	$1,3 \pm 0,7^b$
CCh	$2,74 \pm 0,86^c$	$1,08 \pm 0,21^c$	$1,66 \pm 0,94^b$	$3,02 \pm 0,54^a$
HCh	$4,89 \pm 0,59^b$	$2,17 \pm 0,34^b$	$2,73 \pm 0,86^{a,b}$	$1,38 \pm 0,65^b$
CB15	$2,23 \pm 0,39^c$	$1,32 \pm 0,23^c$	$0,91 \pm 0,33^b$	$1,62 \pm 0,33^b$
HB15	$6,22 \pm 0,6^a$	$2,9 \pm 0,38^a$	$3,32 \pm 0,81^a$	$1,5 \pm 0,47^b$
CB75	$2,61 \pm 0,37^c$	$1,37 \pm 0,15^c$	$1,24 \pm 0,37^b$	$1,99 \pm 0,54^b$
HB75	$6,39 \pm 0,96^a$	$3,2 \pm 0,17^a$	$3,19 \pm 1,09^a$	$0,99 \pm 0,49^c$
Valor de P				
Dieta	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Tratamento	< 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,05
Interação	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

* O resultado indicado é a média \pm desvio padrão. Letras superescritas diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna ($p < 0,05$).

A tabela VI mostra os valores da porcentagem de gordura no fígado, o colesterol total e os triacilgliceróis no fígado dos animais.

Quanto à porcentagem de gordura no fígado houve uma interação entre dieta e tratamento. Os grupos que apresentaram os maiores valores foram os grupos H ($44,69 \pm 3,35$), CCh ($37,68 \pm 17,18$), HCh ($45,66 \pm 5,25$), HB15 ($44,53 \pm 2,58$) e HB75 ($52,3 \pm 7,27$), seguidos dos grupos C ($18,37 \pm 7,01$) e do grupo CB75 ($29,17 \pm 7,51$).

Em relação ao colesterol total hepático verificamos uma interação entre dieta e tratamento. O grupo HB75 ($973,93 \pm 120,01$) apresentou o maior valor de colesterol hepático seguido dos grupos CB15 ($630,41 \pm 129,94$), HB15 ($708,06 \pm 86,76$) e CB75 ($690,21 \pm 140,12$). Os grupos H ($347,39 \pm 57,26$) e HC ($342,81 \pm 90,74$) apresentaram valores semelhantes e o grupo C ($108,53 \pm 22,4$) apresentou o menor valor de colesterol hepático.

Quanto aos triacilgliceróis hepático, não verificamos interação entre dieta e tratamento mas, um efeito isolado do tratamento que foi uma redução dos níveis de triacilgliceróis nos grupos que receberam a torta de bixina: CB15, HB15, CB75 e HB75.

TABELA VI – Gordura total, colesterol total e triacilgliceróis no fígado de animais alimentados com uma dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75).

	% Gordura no fígado	CT fígado (mg/g)	TG fígado (mg/g)
C	18,37 ± 7,01 ^b	108,53 ± 22,4 ^d	296,59 ± 96,63
H	44,69 ± 3,35 ^a	347,39 ± 57,26 ^c	330,3 ± 53,48
CCh	37,68 ± 17,18 ^a	205,06 ± 30,44 ^{c,d}	356,31 ± 96,45
HCh	45,66 ± 5,25 ^a	342,81 ± 90,74 ^c	305,3 ± 51,51
CB15	31,37 ± 9,07 ^{a,b}	630,41 ± 129,94 ^b	121,34 ± 41,55
HB15	44,53 ± 2,58 ^a	708,06 ± 86,76 ^b	118,81 ± 47,2
CB75	29,17 ± 7,51 ^b	690,21 ± 140,12 ^b	98,23 ± 58,77
HB75	52,3 ± 7,27 ^a	973,93 ± 120,01 ^a	107,07 ± 19,57
Valor de P			
Dieta	< 0,05	< 0,05	> 0,05
Tratamento	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Interação	< 0,05	< 0,05	> 0,05

* O resultado indicado é a média ± desvio padrão. Letras superescritas diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna ($p < 0,05$).

A tabela VII apresenta os valores da porcentagem de gordura, o colesterol total e os triacilgliceróis nas fezes dos animais.

Os resultados obtidos mostraram uma interação entre dieta e tratamento quanto ao parâmetro porcentagem de gordura nas fezes. Os animais do grupo HB75 apresentaram os maiores valores, seguidos dos animais dos grupos C (5,02±2,19), CCh (8,48±8,66), HCh (6,28±2,2) HB15 (7,74±3,47) e CB75 (6,38±2,98). Já os animais dos grupos que receberam dietas H (4,6±0,33) e CB15 (4,11±1,84) apresentaram os menores valores da porcentagem de gordura nas fezes.

Em relação ao colesterol total nas fezes não verificamos interação entre dieta e tratamento, apenas um efeito isolado das dietas utilizadas.

Os resultados obtidos quanto aos triacilgliceróis das fezes mostraram que houve uma interação entre dieta e tratamento. O grupo que apresentou maior valor de triacilgliceróis nas fezes foi o grupo HCh (472,46±208,07), seguido do grupo H

(288,77±117,57). Os grupos C (85,11±48,52), CCh (109,69±63,5), HB15 (108,75±101,9) e CB75 (118,56±47,59) apresentaram valores estatisticamente semelhantes.

TABELA VII – Gordura total, colesterol total e triacilgliceróis nas fezes de animais alimentados com uma dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75).

	%Gordura nas fezes	CT fezes (mg/g)	TG fezes (mg/g)
C	5,02 ± 2,19 ^{a, b}	150,24 ± 52,55	85,11 ± 48,52 ^c
H	4,6 ± 0,33 ^b	904,45 ± 131,93	288,77 ± 117,57 ^b
CCh	8,48 ± 8,66 ^{a, b}	120,7 ± 48,61	109,69 ± 63,5 ^c
HCh	6,28 ± 2,2 ^{a, b}	945,08 ± 150,88	472,46 ± 208,07 ^a
CB15	4,11 ± 1,84 ^b	116,25 ± 36,58	202,01 ± 97,97 ^{b, c}
HB15	7,74 ± 3,47 ^{a, b}	749,23 ± 228,58	108,75 ± 101,9 ^c
CB75	6,38 ± 2,98 ^{a, b}	153,74 ± 23,81	118,56 ± 47,59 ^c
HB75	11,83 ± 7,61 ^a	850,24 ± 166,02	170,69 ± 80,8 ^{b, c}
Valor de P			
Dieta	> 0,05	< 0,05	< 0,05
Tratamento	< 0,05	> 0,05	< 0,05
Interação	< 0,05	> 0,05	< 0,05

* O resultado indicado é a média ± desvio padrão. Letras superescritas diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna (p<0,05).

A tabela VIII mostra os resultados de peso do fígado, atividade da AST, ALT e ALP dos animais. Os parâmetros AST e ALP e peso do fígado apresentaram interação entre dieta e tratamento enquanto o parâmetro ALT sofreu somente a influência da dieta.

Com relação ao peso do fígado, os animais que receberam dietas HB15 (5,57±0,35 g) e HB75 (5,35±0,48 g) apresentaram os maiores valores, seguidos dos grupos H (4,52±0,42 g) e HCh (4,64±0,31 g). Os grupos C (3,19±0,45 g), CCh (3,02±0,28 g), CB15 (3,44±0,22 g) e CB75 (3,45±0,34 g) apresentaram valores estatisticamente semelhantes.

Com relação aos níveis da AST os grupos que apresentaram maiores atividades dessa enzima foram os H (34,39±7,16 U/L), CCh (36,61±7,04 U/L) e HCh (33,91±5,27 U/L), sendo estatisticamente semelhantes entre si. Os grupos C (19,35±6,62 U/L), CB15 (12,62±4,1 U/L), CB75 (20,77±7,79 U/L), HB15 (21,92±4,18 U/L) e HB75 (15,32±4,43

U/L) apresentaram valores menores da atividade da enzima e estatisticamente semelhantes entre si. A atividade da ALT não sofreu influência dos tratamentos e nem interação das dietas com os tratamentos.

Para a atividade da ALP os grupos que apresentaram maiores atividades de enzima foram os CB15 (28,35±4,55 U/L) e HB75 (30,87±4,41 U/L), seguidos dos grupos C (18,89±6,51 U/L), H (18,21±5,42 U/L), CCh (15,54±1,93 U/L), HCh (20,35±4,01 U/L) e CB75 (19,14±2,32 U/L) que apresentaram valores estatisticamente semelhantes. Já o grupo HB15 (24,43±5,85 U/L) apresentou valores estatisticamente semelhantes a todos os grupos, ou seja, tanto aos grupos que apresentaram maior e menor atividade da enzima.

TABELA VIII – Peso do fígado, atividade da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) séricos de animais alimentados com dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75).

	Fígado (g)	AST (UI)	ALT (UI)	ALP (U/L)
C	3,19 ± 0,45 ^c	19,35 ± 6,62 ^b	7,24 ± 2,31	18,89 ± 6,51 ^{b, c}
H	4,52 ± 0,42 ^b	34,39 ± 7,16 ^a	15,97 ± 5,12	18,21 ± 5,42 ^{b, c}
CCh	3,02 ± 0,28 ^c	36,61 ± 7,04 ^a	7,96 ± 3,62	15,54 ± 1,93 ^c
HCh	4,64 ± 0,31 ^b	33,91 ± 5,27 ^a	17,32 ± 4,66	20,35 ± 4,01 ^{b, c}
CB15	3,44 ± 0,22 ^c	12,62 ± 4,1 ^b	7,46 ± 5,53	28,35 ± 4,55 ^a
HB15	5,57 ± 0,35 ^a	21,92 ± 4,18 ^b	18,21 ± 3,35	24,43 ± 5,85 ^{a, b}
CB75	3,45 ± 0,34 ^c	20,77 ± 7,79 ^b	6,28 ± 3,08	19,14 ± 2,32 ^{b, c}
HB75	5,35 ± 0,48 ^a	15,32 ± 4,43 ^b	22,29 ± 3,86	30,87 ± 4,41 ^a
Valor de P				
Dieta	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Tratamento	< 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,05
Interação	< 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,05

* O resultado indicado é a média ± desvio padrão. Letras superescritas diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna (p<0,05).

A tabela IX mostra os valores obtidos do peso dos rins, uréia e creatinina dos animais.

Quanto ao peso dos rins houve interação entre dieta e tratamento, todos os grupos apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si.

Para a concentração de uréia não houve interação entre dietas e tratamentos, mas, um efeito isolado das dietas e tratamentos utilizados.

Quanto ao parâmetro creatinina o grupo HB75 (108,57±8,8 µmol/L) apresentou maior valor, seguidos dos grupos H (88,63±7,09 µmol/L), CCh (87,49±7,8 µmol/L), HCh (98,15±7,84 µmol/L) e HB15 (93,84±8,55 µmol/L) os quais apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si, e do grupo CB15 (73,44±8,67 µmol/L) e do grupo C (58,93±5,97 µmol/L). O grupo CB75 (62,33±6,05 µmol/L) apresentou valores estatisticamente semelhantes aos grupos CB15 e do grupo C.

TABELA IX – Peso dos rins, uréia e creatinina séricos peso dos rins de animais alimentados com uma dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75).

	Rins (g)	Uréia (mmol/L)	Creatinina (µmol/L)
C	0,75 ± 0,1 ^a	7,48 ± 1,34	58,93 ± 5,97 ^d
H	0,82 ± 0,14 ^a	6,74 ± 0,98	88,63 ± 7,09 ^b
CCh	0,77 ± 0,13 ^a	6,34 ± 1,16	87,49 ± 7,8 ^b
HCh	0,7 ± 0,02 ^a	5,58 ± 1,16	98,15 ± 7,84 ^b
CB15	0,7 ± 0,06 ^a	5,85 ± 0,84	73,44 ± 8,67 ^c
HB15	0,76 ± 0,11 ^a	5,18 ± 1,36	93,84 ± 8,55 ^b
CB75	0,82 ± 0,14 ^a	7,22 ± 0,81	62,33 ± 6,05 ^{c,d}
HB75	0,72 ± 0,05 ^a	5,17 ± 0,55	108,57 ± 8,8 ^a
Valor de P			
Dieta	>0,05	< 0,05	< 0,05
Tratamento	>0,05	< 0,05	< 0,05
Interação	< 0,05	>0,05	< 0,05

* O resultado indicado é a média ± desvio padrão. Letras superescritas diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna (p<0,05).

A tabela X mostra os valores das concentrações dos radicais sulfidrilas totais, livre e ligado a proteína. Todos esses parâmetros apresentaram interação entre dieta e tratamento.

Em relação a concentração de sulfidrilas totais observamos que as maiores concentrações foram encontradas nos grupos CB15 (405,03±75,83 µmol/L) e CB75 (398,36±58,27 µmol/L) e o grupo HB15 (240,53±31,11 µmol/L) apresentou o menor valor de sulfidrilas totais. Os demais grupos apresentaram valores intermediários aos grupos citados.

Quanto ao parâmetro concentração de sulfidrilas livres o grupo que obteve maior valor dessa concentração foi o grupo C (173,97±8,67 µmol/L) e o grupo que apresentou

a menor concentração foi o CB15 (155,78±3,71 µmol/L) e os demais grupos apresentaram valores intermediários a esses dois grupos para a concentração de sulfidrilas livres.

Os resultados da concentração de sulfidrilas ligadas a proteínas mostram que o grupo CB15 (249,25±75,82 µmol/L) apresentou o maior valor desse parâmetro e o grupo que apresentou a menor concentração foi o HB15 (74,14±35,27 µmol/L). Os demais grupos apresentaram concentrações intermediárias aos dois grupos acima citados.

TABELA X – Sulfidrilas totais (SH tt), sulfidrilas livre (Sh livre) e sulfidrilas ligadas a proteínas (Sh prot) séricos de animais alimentados com uma dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75).

	SH tt (µmol/L)	SH livre (µmol/L)	SH prot (µmol/L)
C	333,62 ± 39,49 ^{a, b}	173,97 ± 8,67 ^a	159,65 ± 37,13 ^{b, c}
H	317,85 ± 50,22 ^{b, c}	164,27 ± 6,73 ^{a, c, d}	153,58 ± 54,98 ^{c, d}
CCh	312,55 ± 35,83 ^{b, c}	158,36 ± 6,06 ^{c, d}	154,19 ± 36,53 ^{c, d}
HCh	270,1 ± 51,65 ^{b, c}	169,12 ± 6,64 ^{a, b}	100,97 ± 51,69 ^{c, d}
CB15	405,03 ± 75,83 ^a	155,78 ± 3,71 ^d	249,25 ± 75,82 ^{a, b}
HB15	240,53 ± 31,11 ^c	166,39 ± 9,92 ^{a, c}	74,14 ± 35,27 ^d
CB75	398,36 ± 58,27 ^a	161,39 ± 4,63 ^{b, c, d}	236,97 ± 57,36 ^b
HB75	269,34 ± 45,37 ^{b, c}	166,09 ± 2,22 ^{a, c}	103,25 ± 45,69 ^{c, d}
Valor de P			
Dieta	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Tratamento	> 0,05	< 0,05	> 0,05
Interação	< 0,05	< 0,05	< 0,05

* O resultado indicado é a média ± desvio padrão. Letras superescritas diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna (p<0,05).

A tabela XI mostra os valores da atividade da catalase e paraoxonase (PON).

Os resultados obtidos com relação à atividade da catalase mostram que não houve interação entre dieta e tratamento, mas, um efeito isolado da dieta e do tratamento utilizados.

Para o parâmetro atividade da PON houve interação entre dieta e tratamento, sendo que o grupo de animais que recebeu dieta C apresentou o maior valor, seguidos do grupo CCh. Os grupos HCh e HB75 apresentaram os menores valores para a atividade de PON. Os grupos CB15, HB15 e CB75 apresentaram valores

estatisticamente iguais entre si e semelhantes aos valores dos grupos H, CCh, HCh e HB75.

TABELA XI – Atividade da catalase e paraoxonase (PON) séricos de animais alimentados com uma dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75).

	Catalase (U/mL)	PON (U/mL)
C	462,95 ± 207,15	160,46 ± 8,33 ^a
H	667,32 ± 289,61	83,59 ± 17,57 ^c
CCh	381,28 ± 194,14	118,51 ± 7,09 ^b
HCh	802,18 ± 274,81	91,22 ± 17,93 ^c
CB15	862,08 ± 273,37	108,3 ± 9,77 ^{b,c}
HB15	1063,75 ± 332,8	97,9 ± 20,23 ^{b,c}
CB75	558,97 ± 148,14	118,16 ± 16,61 ^{b,c}
HB75	600,65 ± 134,52	79,36 ± 10,65 ^c
Valor de P		
Dieta	< 0,05	< 0,05
Tratamento	< 0,05	< 0,05
Interação	> 0,05	< 0,05

* O resultado indicado é a média ± desvio padrão. Letras superescritas diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna ($p < 0,05$).

A tabela XII mostra os resultados glicose, proteínas totais e albumina. Quanto à concentração glicose houve interação entre dietas e tratamento e todos os grupos apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si.

Com relação à concentração de proteínas totais e da concentração de albumina não houve efeito da interação entre dietas e tratamentos, mas, houve efeito das dietas e dos tratamentos de forma isolada.

TABELA XII – Glicose, proteínas totais e albumina séricos de animais alimentados com uma dieta padrão (C), hipercolesterolemia (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75).

	Glicose (mmol/L)	Proteínas totais (g/L)	Albumina (μmol/L)
C	7,58 \pm 1,3 ^a	63,27 \pm 4,16	330,34 \pm 11,94
H	6,4 \pm 1,66 ^a	55,1 \pm 2,92	269,32 \pm 10,58
CCh	6,61 \pm 2,53 ^a	63,08 \pm 4,33	330,68 \pm 14,35
HCh	7,71 \pm 1,49 ^a	57,82 \pm 3,62	269,14 \pm 13,79
CB15	7,88 \pm 0,62 ^a	63,87 \pm 4,29	336,51 \pm 13,85
HB15	7,74 \pm 0,84 ^a	60,76 \pm 2,71	288,23 \pm 10,27
CB75	6,31 \pm 2,09 ^a	65,64 \pm 4,05	309,75 \pm 14,12
HB75	8,61 \pm 0,92 ^a	63,05 \pm 2,53	266,91 \pm 9,81
Valor de P			
Dieta	> 0,05	< 0,05	< 0,05
Tratamento	> 0,05	< 0,05	< 0,05
Interação	< 0,05	> 0,05	> 0,05

* O resultado indicado é a média \pm desvio padrão. Letras superescritas diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna ($p < 0,05$).

A tabela XIII mostra os valores da concentração de hemoglobina e os pesos do baço e coração. Com relação à concentração Hb não houve efeito da dieta e nem interação entre dieta e tratamento, mas, houve efeito dos tratamentos utilizados.

Quanto ao peso do baço houve uma interação entre dieta e tratamentos. O grupo CB75 apresentou a maior valor seguido dos demais grupos que apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si. Quanto ao peso do coração houve interação entre dieta e tratamentos e os animais do grupo H (0,72 \pm 0,09 g) e CB75 (0,71 \pm 0,11 g) apresentaram os maiores valores seguidos dos demais grupos que apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si.

TABELA XIII – Hemoglobina (Hb) séricos e peso do baço e coração de animais alimentados com uma dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75).

	Hb ($\mu\text{mol/L}$)	Baço (g)	Coração (g)
C	20,44 \pm 1,66	0,14 \pm 0,03 ^b	0,38 \pm 0,06 ^b
H	19,09 \pm 2,7	0,14 \pm 0,05 ^b	0,72 \pm 0,09 ^a
CCh	20,34 \pm 2,14	0,12 \pm 0,02 ^b	0,37 \pm 0,06 ^b
HCh	20,43 \pm 2,33	0,14 \pm 0,03 ^b	0,43 \pm 0,04 ^b
CB15	23,11 \pm 1,57	0,1 \pm 0,01 ^b	0,44 \pm 0,05 ^b
HB15	22,64 \pm 1,83	0,11 \pm 0,02 ^b	0,44 \pm 0,03 ^b
CB75	22,68 \pm 1,83	0,18 \pm 0,07 ^a	0,71 \pm 0,11 ^a
HB75	22,98 \pm 1,16	0,1 \pm 0,01 ^b	0,43 \pm 0,03 ^b
<i>Valor de P</i>			
Dieta	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Tratamento	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Interação	>0,05	< 0,05	< 0,05

* O resultado indicado é a média \pm desvio padrão. Letras superescritas diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna ($p < 0,05$).

A tabela XIV mostra os valores de peso inicial, peso final e ingestão. Em nenhum desses parâmetros houve interação entre dieta e tratamento. Observamos um efeito do tratamento no peso final e um efeito da dieta na ingestão nos animais.

TABELA XIV – Valores do peso inicial e peso final de animais alimentados com uma dieta padrão (C), hipercolesterolemiantes (H), padrão + infusão aquosa de urucum (CCh), hiper + infusão aquosa de urucum (HCh) e padrão e hiper contendo 0,015% ou 0,075% de torta de bixina (CB15, HB15, CB75 e HB75).

	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Ingestão (g)
C	108,25 \pm 17,06	90,38 \pm 15,05	81,17 \pm 36,61
H	105,5 \pm 12,66	88 \pm 11,59	81,67 \pm 15,37
CCh	100,63 \pm 7,21	92,38 \pm 5,5	51,96 \pm 15
HCh	105 \pm 4,57	94,5 \pm 4,17	80,73 \pm 21,32
CB15	100,38 \pm 12,29	102,75 \pm 7,03	66,62 \pm 26,96
HB15	107,75 \pm 5,78	104,88 \pm 13,11	89,62 \pm 11,11
CB75	109,38 \pm 11,96	105,88 \pm 14,22	56,81 \pm 18,82
HB75	109,88 \pm 6,24	104,63 \pm 8,53	82,12 \pm 28,64
<i>Valor de P</i>			
Dieta	>0,05	>0,05	< 0,05
Tratamento	>0,05	< 0,05	>0,05
Interação	>0,05	>0,05	>0,05

* O resultado indicado é a média \pm desvio padrão. Letras superescritas diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS



CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

2.1 – METABOLISMO LIPÍDICO

Numerosos estudos experimentais, epidemiológicos, ensaios clínicos e metanálises estabeleceram claramente a associação entre dislipidemia e aumento do risco de morte. A elevação dos níveis plasmáticos de colesterol de baixa densidade (LDL-C), a redução do colesterol de alta densidade (HDL-C) e também o aumento dos triacilgliceróis (TG), são fatores de risco para eventos cardiovasculares, sendo esta a principal causa de morte no mundo (MAGALHÃES *et al.*, 2004).

O aumento da concentração sérica de lipídios está associada a inúmeras doenças, entre elas aterosclerose e carcinoma coloretal, cujos desencadeamentos envolvem a participação de radicais livres. A procura por novos compostos com capacidade de reduzir e/ou regular a concentração de triacilgliceróis e colesterol plasmático tem aumentado através dos anos, resultando em um aumento de publicações descrevendo atividades de uma variedade de produtos naturais (JAHROMI *et al.*, 1993). Entretanto, extratos de plantas frequentemente utilizadas com esta finalidade, são misturas bastante complexas de diferentes compostos, com polaridades distintas, propriedades antioxidantes e pró-oxidantes, algumas vezes apresentando ações sinérgicas entre os componentes individuais (KÄHKÖNEN *et al.*, 2001; PAREJO *et al.*, 2002). Desse modo, o urucum e a bixina vêm sendo utilizada por seu possível papel na redução do colesterol sérico.

Essa atividade, associada ao efeito hipolipidêmico destes compostos, é importante, pois, no processo de formação de placas na aterosclerose, ocorrem inflamações e depósito de colesterol oxidado nas artérias. A ação antioxidante dos carotenóides, entre os quais se incluem a bixina e a norbixina, protegeria o endotélio dos danos desta lipoproteína. As lesões ateroscleróticas iniciam-se após algum tipo de injúria ao endotélio, normalmente causada pela LDL oxidada. Os carotenóides são captados neste processo e impedem esta oxidação (FONTANA *et al.*, 2000). Os

carotenóides possuem ligações duplas conjugadas em suas estruturas, que atuam como antioxidantes (FONTANA *et al.*, 2000).

Muitos trabalhos demonstraram a ação hipocolesterolemizante da curcumina, que também é um carotenóide como a bixina. Segundo SUBBA RAO *et al.*, 1970, a curcumina reduz os níveis séricos e hepáticos de colesterol, além de aumentar a excreção fecal de sais biliares e colesterol em ratos normais e hiperlipidêmicos.

Os dados na literatura sobre os efeitos do urucum sobre colesterolemia e aterosclerose são escassos, mas, SILVA *et al.*, 2001 mostraram que o tratamento com bixina inibiu a peroxidação de lipídeos e a depleção de glutathiona renal induzida por cisplatina em ratos machos. Dados obtidos em nosso laboratório mostraram que a infusão aquosa de sementes de urucum apresentam efeito hipocolesterolêmico em ratos machos (SILVA *et al.*, 2000), indicando que a infusão de urucum (e/ou a bixina), provavelmente, tem algum efeito sobre fatores que influenciam o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

SILVA *et al.* (2005) estudando um possível efeito hipocolesterolêmico da bixina oleosa 8% em ratos machos *Fisher*, observaram uma redução dos níveis séricos de colesterol. Esse efeito hipocolesterolemizante da bixina em ratos *Wistar* também foi demonstrado por SOUZA (2001) onde foram administrados três doses de bixina (70, 350, 700 mg) e não foi observado nenhum efeito tóxico.

ROSSONI Jr *et al.*, 2005 estudando o efeito da infusão aquosa e a torta de bixina em ratos machos *Fisher* observaram um efeito hipocolesterolemizante dessas substâncias.

A diminuição do colesterol pode ser explicada pelo fato de que os carotenóides podem aumentar a concentração de HDL (BENDICH, 1994) e com isso reduzir a concentração de colesterol total, já que o HDL retira o colesterol da corrente sanguínea e o leva ao fígado para que possa ser metabolizado.

LIMA *et al.*, (2001), com o objetivo de testar os carotenóides bixina e norbixina e o flavonóide quercetina (0,01 mol/Kg corporal por via oral) em coelhos da raça Nova Zelândia, verificaram que o carotenóide bixina apresentou uma maior redução nos níveis séricos de colesterol total e uma menor redução da fração HDL-C em comparação à demais substâncias testadas. A bixina, se comparada com a norbixina, apresentou um melhor efeito na redução do colesterol total. Quanto aos triacilgliceróis a bixina em associação com a quercetina obteve excelente efeito hipolipidêmico.

Pesquisa avaliando corantes naturais e flavonóides também foram realizadas por OLIVEIRA *et al.* (2001), os quais testaram a naringina e o corante monascus isoladamente e associados. A associação destes reduziu as concentrações de colesterol em 66,70%, aumentou a lipoproteína de alta densidade (HDL) em 16,14% e diminuiu os triacilgliceróis em 63,33%.

RODRIGUES (2003) com o objetivo de avaliar o efeito do flavonóide naringenina (30mg/Kg) e do carotenóide bixina (125 mg/Kg) e suas associações com o leite em pó de vaca, cabra e o extrato hidrossolúvel de soja, sobre o metabolismo lipídico de coelhos, realizou experimentos com coelhos da raça Nova Zelândia. Na dieta com leite de vaca e adição de bixina houve uma redução do colesterol total (24,52% no 16º dia, e, de 22,53% no 31º dia). Quanto aos triacilgliceróis houve uma redução no grupo que recebeu o tratamento com bixina e com naringenina + bixina, embora estes resultados não sejam diferentes estatisticamente. Em relação à fração HDL-C não houve diferenças significativas entre os tratamentos utilizados.

Na dieta com leite de cabra não houve diferenças significativas entre os grupos quanto ao parâmetro colesterol total. Quanto aos triacilgliceróis, houve um aumento nos valores séricos dos animais que receberam bixina (8,60% e 1,95% no 16º e 31º dia respectivamente). Em relação a fração HDL-C foi observado um aumento nos animais tratados com bixina (56,79% com 16 dias e 40,39% com 31 dias) embora esse resultado não seja diferente estatisticamente dos outros grupos.

Portanto, o que encontramos na literatura são evidências em que utilizando-se coelhos, ratos e camundongos tratados com bixina, são encontrados efeitos hipocolesterolemiantes.

O rato, como a maior parte dos animais carrega o colesterol plasmático predominantemente através da HDL. Por esta razão, o rato, por exemplo, não é um modelo adequado para estudar os efeitos da dieta no perfil lipídico (KOWALA *et al.*, 1991).

O hamster, desde a década de 80, é um animal que vem sendo bastante utilizado em estudos de efeitos de drogas e dieta no metabolismo de lipídeos e aterosclerose (NISTOR *et al.*, 1987 e SPADY *et al.*, 1983). De modo semelhante ao coelho, o perfil de lipoproteínas do hamster parece-se mais com o dos humanos do que o de ratos ou

camundongos (BRAVO *et al.*, 1994; SUCKLING *et al.* 1991), sendo a principal carreadora de colesterol plasmática a LDL-C, com 50% do colesterol plasmático transportado por essa fração. Além disso, apresentam receptor de LDL-C e a proteína carreadora de ésteres de colesterol (CETP) e triacilgliceróis. Características estas que não estão presentes em ratos e camundongos convencionais (NISTOR *et al.*, 1987).

Dessa forma, temos uma justificativa para o estudo de hipercolesterolemia em hamsteres, pois, não há na literatura trabalhos que relacionem o efeito da bixina e hipercolesterolemia em hamsteres.

Por outro lado, dados da literatura corroboram com nossos resultados, observando um efeito hipercolesterolemizante da infusão aquosa do urucum e da bixina.

DE PAULA *et al.* 2005, utilizando hamsteres machos, observaram um aumento dos níveis séricos de colesterol total, embora não significativo entre os grupos, e uma diminuição da fração HDL quando os animais foram tratados com infusão aquosa de urucum.

Estudo feito por FERNANDES *et al.*, (2002) investigaram o efeito tóxico da norbixina e do extrato de urucum (50 % de bixina) com diferentes concentrações em camundongos e ratos tratados com ração comercial. Em camundongos, utilizando tanto norbixina quanto o extrato de urucum não observaram nenhuma alteração no colesterol total e triacilgliceróis, corroborando com o nosso resultado nos grupos padrão acrescidos de torta de bixina. Em ratos, observaram uma diminuição do colesterol total utilizando-se o extrato de urucum na concentração 7,5 mg/Kg e com a norbixina não observaram nenhuma alteração. Com relação aos triacilgliceróis não foi observada nenhuma alteração nas concentrações séricas de colesterol total e triacilgliceróis.

A tabela V mostra que os animais que receberam dieta hipercolesterolemizante possuem níveis de colesterol total maiores que os animais que receberam dieta padrão. Estes resultados indicam uma eficiência da dieta hipercolesterolemizante usada.

A partir dos nossos resultados obtidos nos parâmetros lipídicos, observamos um aumento nos níveis séricos de colesterol total, da fração HDL-C e da fração não HDL-C nos grupos que receberam dieta hipercolesterolemizante acrescida de bixina nas concentrações 0,015% e 0,075%. Quanto aos triacilgliceróis houve uma redução nos grupos CB15 e CB75 e no grupo HB75 dessa forma não corroborando com os dados presentes na literatura até o momento.

Humanos transportam a maior parte do seu colesterol plasmático nas lipoproteínas VLDL e LDL e estas frações estão geralmente elevadas em indivíduos hipercolesterolêmicos. A concentração elevada dessas lipoproteínas é um importante fator para o desenvolvimento da aterosclerose. Por outro lado, na maioria dos modelos animais o colesterol é carregado pela HDL. Uma linhagem especial de hamsteres, criada nos EUA, chamada de Bio F₁B, por sua vez, ao ser alimentada com dieta hipercolesterolemiantes, apresenta perfil de lipoproteínas comparável aos humanos (KOWALA *et al.*, 1993; TRAUTWEIN *et al.*, 1993 a, b).

A abordagem do nosso trabalho não nos permite propor mecanismos, mas através de resultados da literatura tentaremos sugerir motivos das diferenças existentes entre ratos e hamsteres para o tratamento com a bixina.

A regulação da concentração plasmática de colesterol envolve fatores que influenciam tanto o metabolismo do colesterol intracelular como extracelular. Duas enzimas chaves estão envolvidas nesse processo, a HMG-CoA redutase e a acil-CoA-colesterol acil transferase (ACAT). Esses mecanismos de forma sinérgica tentam manter um pool constante de colesterol no organismo. Dessa forma, animais com uma alimentação hipercolesterolemiantes apresentam uma síntese endógena de colesterol diminuída.

A etapa limitante da síntese endógena de colesterol é a HMG-CoA redutase, que é uma proteína intrínseca do retículo endoplasmático e a sua atividade pode ser regulada por quatro maneiras: inibição retroativa (*feedback*), controle hormonal, redução de sua transcrição mediada por esterol ou inibição por meio de drogas (BROWN e GOLDSTEIN, 1980).

No nosso caso não podemos dizer que não está ocorrendo um bloqueio por *feedback* da HMG-CoA redutase porque, como os níveis de colesterol estão altos, isso por si só já é limitante na síntese de colesterol endógeno. O que pode estar acontecendo com nossos hamsteres é uma não conversão do excesso de colesterol em sais biliares pela 7- α -hidroxilase (CYP7 α 1), ou seja, a bixina pode estar influenciando em algum passo desta via de conversão. Uma outra hipótese que pode estar ocorrendo também é uma inibição da ACAT, ou seja, não está acontecendo a esterificação do colesterol.

A estrutura em anel do colesterol não pode ser metabolizada a CO₂ e H₂O em mamíferos. Em vez disso, o anel esterol intacto é eliminado do corpo por conversão em ácidos biliares. Assim a síntese e a excreção dos ácidos biliares compreendem a maior via de catabolismo do colesterol em mamíferos. A síntese dos ácidos biliares promove um modo direto de conversão do colesterol, que é hidrofóbico e insolúvel em água, em uma molécula solúvel e rapidamente excretada. As etapas biossintéticas que completam esta transformação também conferem propriedades detergentes para os ácidos biliares as quais são exploradas pelo corpo para facilitar a secreção do colesterol do fígado (RUSSELL, 2003).

Enzimas denominadas citocromo P450 (P450s) conhecidas como CYP 7 α 1, 27 α 1, 11 α 1, and 46 α 1 catalisam os primeiros passos em diferentes vias do metabolismo do colesterol (PIKULEVA, 2006).

A transformação do colesterol em ácidos biliares no fígado envolve 17 diferentes enzimas, sendo os produtos iniciais referidos como ácidos biliares primários (RUSSELL, 2003), e pode se dar por meio de duas vias: a via clássica e a via alternativa (CHIANG, 2004).

Na via clássica, a síntese de ácidos biliares consiste em uma cascata de quatorze etapas catalisadas por enzimas localizadas no citoplasma, microsossomos, mitocôndrias e peroxissomos, sendo a enzima microsossomal chave e limitante da velocidade de reação, a 7- α -hidroxilase (CYP7 α 1) (CHIANG, 2004), a qual é expressada apenas no fígado (RUSSELL, 2003). No fígado, a 7- α -hidroxilase, converte o colesterol a uma molécula de 7- α -hidroxicolesterol, a maior fonte de ácidos biliares (JAVITT, 2002), que após uma série de reações transforma-se em dois produtos finais: o ácido cólico (AC) e o ácido quenodeoxicólico (ACDC).

O fígado dessa forma é responsável pela conversão de cerca de 500 mg de colesterol em ácidos biliares por dia (RUSSELL, 2003). Essa produção é responsável por cerca de 87% de colesterol que é metabolizado no organismo. Os outros 13% estão assim distribuídos: 8% para tecidos esteróides, 1,2% para cérebro e 3,4% para vários tecidos (PIKULEVA, 2006).

Alguns receptores nucleares têm sido encontrados como sendo os representantes principais na regulação da transcrição de genes envolvidos na síntese de ácidos biliares

(CHIANG, 2004). Entre eles podemos citar o receptor X hepático (RXL), o receptor X farnesóide (RXF) e os receptores ativadores da proliferação de peroxisomos (PPARs).

O LXR, originalmente encontrado no fígado é dimerizado a um outro receptor hormonal nuclear, o receptor X retinóide (RXR), formando um heterodímero RXL/RXR capaz de sinalizar um controle genético da homeostasia do colesterol por *feed-forward* (REDINGER, 2003). Este receptor reconhece ligantes chamados oxisteróis, que são metabólitos oxidados do colesterol, encontrados em diversos tecidos tais como fígado, cérebro e gônadas. Este receptor chave RXL/RXR, uma vez sinalizado pelos oxisteróis, inicia uma via molecular para catabolizar o colesterol à ácidos biliares, durante uma série de eventos, por regulação positiva da enzima 7α -hidroxilase, diminuindo assim os níveis de colesterol intracelular (REDINGER, 2003; WOLTERS *et al.*, 2002).

O RXF, também é dimerizado a RXR formando o dímero RXF/RXR que tem como ligantes os sais biliares. O RXF/RXR age como um sensor de níveis intracelulares de sais biliares e induz a repressão 7α -hidroxilase. Então há uma regulação negativa da atividade da enzima 7α -hidroxilase para reprimir a síntese de ácidos biliares por controle de *feedback* pelos sais biliares que retornam do intestino para o fígado. Esta ação é necessária para prevenir a toxicidade intracelular por níveis excessivos de sais biliares e para acomodar um pool constante de sais biliares dentro da circulação entero-hepática (REDINGER, 2003; WOLTERS *et al.*, 2002).

Verificamos os níveis de gordura, colesterol total e triacilgliceróis nos fígados dos animais (Tab VI). Os fígados dos animais que receberam dieta hipercolesterolemiantes são mais pesados e apresentaram maior teor de gordura do que os fígados dos animais que receberam a dieta padrão. E se compararmos com os animais que receberam dieta hipercolesterolemiantes mais bixina nas concentrações 0,015% e 0,075%, observamos que os fígados desses animais são mais pesados do que os fígados de todos os outros grupos, sugerindo maior acúmulo de gordura.

Em nossos resultados observamos que os animais que receberam bixina apresentaram níveis de colesterol total mais altos. Desse modo, o excesso de colesterol no fígado estaria fazendo com que a expressão de receptores para LDL fosse diminuída e com isso as VLDLs seriam convertidas a LDLs mas, permaneceriam na circulação.

Verificamos também que os animais que foram alimentados com as dietas hipercolesterolemiantes apresentaram concentração de colesterol nas fezes bem maior

se comparados com os animais que receberam dietas padrão. Podemos observar dessa forma que o *pool* de colesterol na circulação estava tão aumentado que tinha que ser eliminado de alguma forma visto que o possível bloqueio da CYP7 α 1 e da ACAT estava impedindo a conversão do excesso em sais biliares e a conversão em ésteres de colesterol, respectivamente.

Outros autores afirmam de forma genérica que hamsteres alimentados com dieta com alto teor de colesterol desenvolvem um perfil de lipoproteínas caracterizado por uma elevada relação VLDL/HDL₂ (HAYES *et al.*, 1992).

2.2 – FUNÇÃO HEPÁTICA

O fígado é o órgão mais importante na manutenção da homeostase do colesterol, sendo também o principal local onde os pigmentos do urucum são metabolizados. Dessa forma, é o órgão central no metabolismo de vários outros carotenóides, assim achamos importante avaliar por meio de parâmetros bioquímicos séricos a função hepática.

Verificamos a atividade da ALT, AST e ALP (Tab VIII) para observarmos se as alterações no metabolismo de lipídeos estavam provocando alguma injúria neste órgão. O que observamos no fígado foi um aumento do peso nos animais hipercolesterolêmicos e nos animais que receberam torta de bixina (HB15 e HB75) apresentando os maiores valores de peso. Esse aumento no peso pode ser explicado pelo maior acúmulo de gordura no fígado devido a dieta hipercolesterolemizante

A AST e a ALT são enzimas intracelulares presentes em grandes quantidades no citoplasma dos hepatócitos. Lesões ou destruição das células hepáticas liberam essas enzimas para a circulação. A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST está presente na mitocôndria. Essa diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas. Em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT (MOTTA, 2003).

Nossos resultados indicaram uma redução da atividade da AST nos grupos que receberam as concentrações de torta de bixina com a dieta padrão e hipercolesterolemiantes e não observamos alterações da ALT em nenhum dos grupos.

Nossos resultados estão de acordo com observações de LIMA *et al.*, 2003. Eles observaram uma redução na concentração da atividade da AST utilizando bixina em associação com quercetina, em coelhos, e a ação dessa enzima se elevou em animais hiperlipidêmicos. Já com relação a ALT, o grupo que recebeu bixina apresentou maior redução na concentração da atividade dessa enzima.

FERNANDES *et al.*, (2002) investigaram o efeito tóxico da norbixina e do extrato de urucum (50 % de bixina) com diferentes concentrações em camundongos e ratos tratados com ração comercial. Em camundongos, utilizando o extrato de urucum e a norbixina, não houve diferença na atividade da AST nos grupos que receberam o tratamento em relação ao controle. Quanto a ALT, também não foram observados nenhuma diferença entre os grupos que receberam o extrato de urucum, mas houve um aumento, sendo o efeito dose dependente nos grupos que receberam norbixina. Em ratos, nenhuma alteração foi verificada nas transaminases, tanto no extrato de urucum quanto na norbixina.

SOUZA (2001), testando o efeito da bixina em diferentes concentrações (70, 350 e 700 mg) e em diferentes tempos (3 e 6 meses) sobre parâmetros bioquímicos séricos em fêmeas de ratos *Wistar*, alimentados com dieta comercial, encontrou diferença na atividade da AST no terceiro mês de administração de bixina na concentração de 350 mg, em relação ao controle. O que a levou supor que, a bixina pode ter tido alguma ação na regeneração hepática. Quanto a ALT não houve diferenças significativas em relação ao controle em nenhum dos tratamentos utilizados.

DE PAULA *et al.*, (2005), utilizando hamsteres machos *Golden Syrian* tratados com infusão aquosa de urucum observaram um aumento na atividade da AST nos grupos que receberam dieta padrão e hipercolesterolemiantes mais a infusão aquosa do urucum e nenhuma diferença estatística foi observada na atividade ALT nos grupos.

Em outro trabalho DE PAULA *et al.*, (2005), utilizando ratos machos *Fisher* tratados com infusão aquosa de urucum; o grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiantes mais infusão aquosa de urucum apresentou valores da atividade da AST e ALT semelhantes estatisticamente aos grupos controle.

Analisando os nossos dados, podemos sugerir que a bixina exerceu um efeito redutor na atividade da AST nos animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes. Essa diminuição pode indicar uma proteção hepatocelular já que, as atividades das enzimas estão aumentadas no grupo H em relação aos grupos HB15 e HB75. Uma outra possibilidade é a de que a atividade da AST está diminuída devido a um menor número de células funcionais ou efeito inibitório das enzimas pelo uso da bixina.

FERNANDES *et al.*, (2002) investigaram o efeito tóxico da norbixina e do extrato de urucum (50 % de bixina) com diferentes concentrações, em camundongos e ratos tratados com ração comercial. Não observaram diferenças na atividade da ALP em camundongos e ratos utilizando extrato de urucum e norbixina.

A fosfatase alcalina pertence a um grupo de enzimas que catalizam a hidrólise de vários fosfomonoésteres em pH alcalino. Como a fosfatase alcalina está localizada nas membranas de revestimento dos canálculos biliares, a enzima está elevada nas desordens do trato biliar. Ocorrendo impedimento do fluxo biliar, a fosfatase alcalina sérica atinge 2-3 vezes os valores de referência (podendo chegar a 10-15 vezes), dependendo do grau de estase biliar. Esses aumentos são devidos, fundamentalmente, ao: (a) incremento na síntese da enzima, (b) retenção de ácidos biliares no fígado, que solubilizam a fosfatase alcalina e a removem da membrana plasmática dos hepatócitos e (c) regurgitação da enzima para a circulação pelo impedimento da excreção (MOTTA, 2003).

Os animais que receberam dietas HB75 e CB15 apresentaram os valores mais altos da atividade dessa enzima. Pode estar ocorrendo um quadro de colestase intra ou extra-hepática causada pela dieta hipercolesterolemiantes ou pelo acréscimo de torta de bixina nas dietas, provocando a interrupção do fluxo biliar devido a uma hiper saturação dos componentes da bile provocada pela dieta hipercolesterolêmica e ou pela adição de torta de bixina na dieta.

2.3 – FUNÇÃO RENAL

A regulação dos líquidos e eletrólitos e a eliminação dos resíduos metabólicos são essenciais à homeostase corpórea. O sistema renal exerce papel fundamental na

realização destas funções. A função renal tem sido estudada nas últimas décadas por exames convencionais como a determinação da uréia e creatinina séricos (MOTTA, 2003).

Em nosso experimento observamos que a substância testada não afetou o peso dos rins (Tab IX).

A funcionalidade renal foi monitorada pela determinação dos níveis plasmáticos de uréia e creatinina. Nossos resultados com relação a uréia mostram que a bixina diminuiu sua concentração nos grupos que receberam dietas hipercolesterolemiantes mais os tratamentos. Quanto a creatinina foi observado um aumento da sua concentração no grupo HB75 e nos grupos que receberam dietas padrão acrescidas do tratamentos.

Estudos comprovam que dislipidemias contribuem para a progressão da aterosclerose e doenças crônicas nos rins e que doenças crônicas nos rins levam ao desenvolvimento de anormalidades no metabolismo lipídico contribuindo para o aumento de doenças cardiovasculares (ABRASS, 2004; ZAGER *et al.*, 2001).

A uréia é o principal produto do catabolismo das proteínas e aminoácidos, é solúvel em água e é excretada na urina (BRODY, 1993). Ela é responsável por 80% do nitrogênio não-protéico excretado na urina, em condições normais (LIMA *et al.*, 1985).

LIMA *et al.*, (2003) avaliando a ação do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina (0,01 mol/kg) em coelhos hiperlipidêmicos da raça Nova Zelândia, observaram a diminuição da concentração da uréia nos grupos que receberam bixina e bixina + quercetina.

A creatinina é o composto nitrogenado do sangue menos variável. Seus valores independem da ingestão de proteínas da alimentação e não é afetada pelo volume urinário (LIMA *et al.*, 1985). A creatinina é produzida como resultado da desidratação não-enzimática da creatina muscular. A creatina, por sua vez, é sintetizada no fígado, rim e pâncreas e é transportada para as células musculares e cérebro, onde é fosforilada. Tanto a creatina-fosfato como a creatina, em condições fisiológicas, espontaneamente perdem o ácido fosfórico ou água, respectivamente, para formar o anidrido – creatinina.

A creatinina livre não é reutilizada no metabolismo corporal e assim funciona somente como um produto dos resíduos de creatina. A creatina difunde do músculo para o plasma de onde é removida quase inteiramente e em velocidade relativamente

constante por filtração glomerular. A quantidade de creatina excretada diariamente é proporcional à massa muscular e não é afetada pela dieta, idade, sexo ou exercício e corresponde a 2% das reservas corpóreas da creatina-fosfato (MOTTA, 2003).

LIMA *et al.*, (2003) avaliando a ação do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina (0,01 mol/kg) em coelhos hiperlipidêmicos da raça Nova Zelândia, observaram em relação a creatinina que, o grupo que recebeu bixina foi o que obteve maiores reduções de seus níveis.

FERNANDES *et al.*, (2002) investigaram o efeito tóxico da norbixina e do extrato de urucum (50 % de bixina) em camundongos e ratos em diferentes concentrações, tratados com ração comercial. Em camundongos foi observado uma pequena redução na concentração da uréia. A concentração de creatinina foi reduzida em camundongos tratados com extrato de urucum em apenas um grupo (66 mg/Kg). Em ratos, nenhuma alteração foi observada na concentração de uréia e creatinina.

Dessa forma, podemos dizer que nas condições experimentais estabelecidas não observamos efeitos protetor da torta de bixina e da infusão aquosa do urucum pois, observamos um aumento na concentração sérica de creatinina visto que a creatinina é um marcador de função renal muito útil em função da sua relativa independência de fatores como dieta, grau de hidratação e metabolismo protéico. Sua determinação plasmática é um teste de função renal mais seguro do que a uréia, pois nas doenças renais, sua concentração se eleva mais vagarosamente do que a uréia (BURTIS e ASHWOOD,1998).

2.4 – DEFESAS ANTIOXIDANTES

É grande o número de doenças em que se sugere o envolvimento dos radicais livres. Questiona-se, na maioria dos casos, se estas espécies representam a causa ou meramente a consequência destas doenças. Radicais livres e EROs podem contribuir para o aparecimento de doenças ou estarem presentes em situações de toxicidade.

Os radicais livres gerados no organismo podem atacar macromoléculas como o DNA, proteínas e membranas prejudicando o funcionamento das mesmas, através de

alterações da fluidez, na permeabilidade e inativação de receptores de membrana. Os danos causados pelos radicais livres podem levar à morte celular ou alteração de função das células. Além disso, tem sido considerado que a lipoperoxidação está relacionada a diversas desordens patológicas como a aterosclerose e o câncer (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990; NIKI, 2004).

Fisiologicamente, a defesa contra o dano provocado por ERO/ERN é realizado pela utilização de reservas antioxidantes celulares. A função primária dos antioxidantes é reduzir a velocidade de iniciação e/ou propagação dos processos radicalares, suprimindo a geração de espécies reativas ou, eliminando-as, diminuindo, ou até mesmo inibindo o dano oxidativo a uma molécula alvo. Um antioxidante é, então, qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas àquelas de um substrato oxidável, atrasa significativamente, ou ainda evita a oxidação deste substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A ERO e as ERN são capazes de interferir em vários processos biológicos, onde o dano causado está relacionado com o tipo de espécie reativa e a molécula atacada. Os principais alvos moleculares das espécies reativas são lipídios, proteínas, ácidos nucléicos e açúcares.

A peroxidação de lipídios é iniciada pelo ataque de qualquer espécie suficientemente reativa, capaz de abstrair um átomo de hidrogênio de uma grupo metileno (-CH₂-) de uma molécula de ácido graxo. Os ácidos graxos poliinsaturados são particularmente sensíveis a esse ataque, o que apresenta grande importância biológica, uma vez que a maior parte dos ácidos graxos presentes em membranas de células animais e em lipoproteínas são poliinsaturados. A presença da ligação dupla na cadeia carbônica do ácido graxo enfraquece a ligação do átomo de hidrogênio ligado ao carbono adjacente, especialmente se houver ligação dupla de um ou de ambos os lados do -CH₂-. O •OH pode iniciar, com muita facilidade, a cascata de lipoperoxidação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Carotenóides são antioxidantes que protegem a integridade celular e diminuem o risco de doenças degenerativas e aumentam a ação do sistema imunológico (STAHL e SIES, 1996).

Diante disso dosamos a concentração de sulfidrilas totais e livres, catalase e paraoxonase.

O radical $\bullet\text{OH}$ é considerado a espécie mais reativa do sistema biológico. A combinação extremamente rápida do $\bullet\text{OH}$ com metais e outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. O hidroxila pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1986).

A glutathiona reduzida (GSH, L-g-glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células e é o grupamento tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula (FANG *et al.*, 2002).

Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG e depleção de GSH. Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo (HALLIWELL, 1993). Assim, a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH. No soro, grupos sulfidrilas presentes em albumina apresentam importante papel nas defesas antioxidantes. A albumina é a principal fonte de grupos tióis no plasma e é quantitativamente o mais importante componente extracelular de defesa antioxidante. Por isso determinamos os níveis séricos de sulfidrilas livres que englobam sulfidrilas presentes em moléculas de baixo peso molecular como cisteína, glutathiona, homocisteína, cisteinil-glicina e grupos sulfidrilas presentes em proteínas, sendo essa outra fonte de grupos tióis. (MIRCESCU *et al.*, 2005; KLEINMAN *et al.*, 2000).

Em nosso experimento podemos observar que o grupo CB75 apresentou a maior concentração de sulfidrilas totais e que os grupos que receberam dietas hipercolesterolemiantes não apresentaram valores estatisticamente diferentes entre si. Em relação à sulfidrilas livres observamos que os grupos que receberam dietas padrão com os tratamentos apresentaram concentrações menores se comparados ao grupo que recebeu dieta padrão e os animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Já em relação a sulfidrilas ligadas a

fração protéica observamos que houve um aumento de 50% da sua concentração nos animais que receberam dietas padrão mais a torta de bixina e uma diminuição de 30% na sua concentração nos animais que receberam dieta hipercolesterolemiantes mais torta de bixina. Assim, parece que de fato a bixina exerceu um efeito antioxidante, mas, na condição de maior estresse desencadeado pela dieta, tal efeito não pode ser visto.

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 . É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. Sua atividade é dependente de NADPH (SCOTT *et al.*, 1991).

O H_2O_2 não é um radical livre, mas sim uma ERO, uma vez que não possui elétrons desemparelhados no orbital mais externo. Apesar de não ser uma espécie reativa, o H_2O_2 é capaz de inativar enzimas, principalmente pela oxidação dos grupos tióis essenciais. O seu maior potencial, entretanto, é exercido de forma indireta pela geração do radical hidroxila na reação de Fenton. O H_2O_2 nessas condições torna-se um bom oxidante. Quando em concentrações suficientes, sua toxicidade é aumentada de 10 a 100 vezes em presença de ferro, podendo, dessa forma, destruir estruturas celulares (EATON, 1991).

A suplementação de catalase exógena previne a oxidação da GSH mediada pelo H_2O_2 , em eritrócitos humanos normais (SCOTT *et al.* 1991).

A supressão da catalase foi demonstrada inibir a adesão leucocitária mediada por LDL oxidadas (SHI *et al.*, 2004), agindo, portanto, como uma das defesas antioxidantes do organismo e suporta ainda a hipótese de que H_2O_2 desempenha um papel na patogênese da aterosclerose.

Com relação a catalase observamos que a bixina possui uma tendência a aumentar a atividade dessa enzima nos grupos HCh, CB15 e HB15 em relação aos seus respectivos controles (grupos padrão e hipercolesterolemiantes). Dessa forma, podemos supor que a bixina na concentração 0,015% atuou no nosso modelo aumentando o efeito antioxidante e em nenhum dos grupos ocorreu uma diminuição da concentração da atividade dessa enzima.

Em nosso experimento, os animais que receberam dieta padrão apresentaram atividade de PON maiores do que os animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes, dados corroborados por AYUB *et al.*, (1999), AVIRAN *et al.*, (1998) e SHIH *et al.*, (1996) demonstrando que animais alimentados com dietas ricas

em gorduras e colesterol apresentam redução na expressão gênica e a atividade sérica da PON. Por outro lado, os animais que receberam dieta padrão mais os tratamentos com torta de bixina e infusão aquosa de urucum apresentaram uma diminuição da atividade de PON se comparados com o grupo que recebeu dieta padrão (controle), diferença não observada nos grupos hipercolesterolemiantes.

Tem sido descritas, até o presente momento, três tipos de paraoxonase: PON-1, 2 e 3. PON-1 é uma proteína de 354 aminoácidos, encontrada no cromossomo 7, dependente de cálcio e é distribuída entre os tecidos do fígado, rim, intestino e no soro. No soro é quase exclusivamente localizada na HDL-C sendo que mudanças na forma e tamanho da HDL-C pode afetar a afinidade da ligação e estabilidade da PON-1 e com isso reduzir sua capacidade antioxidante. PON-1 liga-se reversivelmente a substratos organofosfatos, dessa forma é um dos principais meios de proteção do sistema nervoso contra neurotoxicidade de organofosfatos (DURRINGTON *et al.*, 2001). PON-2 é encontrada mais em tecidos, mas não na circulação enquanto PON-3 está associada com o HDL-C como a PON-1 (AVIRAM, 2004).

Modificações da atividade da PON sérica pode ser demonstrada em pacientes afetados por doenças associadas com alterações do metabolismo de lipoproteínas, como: diabetes melitus, hipercolesterolemia familiar e síndrome metabólica (SENTI *et al.*, 2003).

Estudos envolvendo a análise do efeito da bixina sobre a atividade da PON em animais submetidos a dietas hipercolesterolemiantes não são conhecidos. Em uma condição de estresse oxidativo, não só a LDL é modificada, mas outros lipídeos séricos, inclusive a HDL. A PON inibe a oxidação da HDL, preservando sua função antiaterogênica no transporte do colesterol, tão bem quanto da oxidação da LDL (AVIRAM *et al.*, 1998). A presença de PON na HDL pode ser um contribuinte importante para antiaterogenicidade dessa lipoproteína.

2.5 – OUTROS METABÓLITOS

O fígado é o único órgão responsável pela produção da albumina e é o responsável pelo metabolismo de proteínas e glicose. Dosamos glicose, proteínas totais e albumina com o intuito de analisarmos as alterações hepáticas.

FERNANDES *et al.*, (2002) utilizando extrato de urucum e norbixina em camundongos e ratos tratados com ração comercial, observaram que em camundongos a concentração de glicose foi diminuída (19,5%) em um grupo que recebeu extrato de urucum (351 mg/Kg) enquanto que a norbixina apresentou uma redução na glicose de 14,4% no grupo que recebeu 0,8 mg/Kg, 20% no grupo 7,6 mg/Kg e 21,5% no grupo que recebeu 66 mg/Kg. Já em ratos o que observaram foi um aumento da concentração de glicose ao invés de uma diminuição tanto nos grupos que receberam extrato de urucum quanto norbixina.

A tabela XII mostra os valores da concentração sérica de glicose onde podemos observar que não houve diferenças significativas entre todos os grupos e dessa forma podemos afirmar que nenhum dos tratamentos utilizados interferiram na concentração de glicose,

O número de proteínas distintas dentro de uma célula humana é estimado entre 3000 a 5000. Mais de 300 proteínas diferentes foram identificadas somente no plasma sanguíneo. Muitas delas apresentam papéis bioquímicos específicos sendo que as suas concentrações podem ser afetadas por processos patológicos e, portanto, são determinadas na investigação de várias doenças.

A albumina compreende ao redor de 60% das proteínas presentes no plasma humano. É sintetizada no fígado (aproximadamente 15 g/dia) em velocidade dependente da ingestão protéica, mas regulada por retroalimentação pelo teor de albumina circulante. Exerce importantes funções como: regulação osmótica e transporte e armazenamento (transporte de ácidos graxos de cadeia longa e esteróides, bilirrubina e transporte de fármacos) (MOTTA, 2003).

LIMA *et al.*, (2003) avaliando a ação do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina (0,01 mol/kg) em coelhos hiperlipidêmicos da raça Nova Zelândia, observaram uma pequena diminuição da concentração de proteínas totais.

FERNANDES *et al.*, (2002) utilizando extrato de urucum e norbixina em camundongos e ratos, não encontraram diferenças significativas nas concentrações de proteínas totais e albumina em camundongos e ratos tratados com ração comercial.

DE PAULA *et al.* (2005), utilizando hamsteres machos *Golden Syrian* tratados com infusão aquosa de urucum, encontraram diferenças significativas nas concentrações de proteínas totais e albumina apenas nos animais que receberam dietas controle. Por outro lado, nos animais alimentados com dieta hipercolesterolemizante não foi observado diferenças significativas.

Em outro trabalho DE PAULA *et al.*, (2005) utilizando ratos machos *Fisher* hipercolesterolêmicos tratados com infusão aquosa de urucum não observaram diferenças estatísticas significativas na concentração sérica de albumina e proteínas totais.

No nosso experimento não encontramos interação entre dieta e tratamentos, e dessa forma podemos concluir que a infusão aquosa de urucum e a torta de bixina não estão afetando as concentrações séricas de proteínas totais e a síntese de albumina ou seja, mais uma vez podemos supor que não está ocorrendo um efeito tóxico dos tratamentos utilizados sobre o fígado, visto que reduções nos níveis de proteínas totais pode ser associado com doenças renais ou hepáticas.

CONCLUSÕES

CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES

De acordo com os tratamentos utilizados podemos concluir que:

Nos grupos que receberam dieta padrão mais tratamentos:

- Os animais que receberam dietas padrão acrescidas de torta de bixina não apresentaram aumento nos níveis de colesterol total; HDL-C e fração não HDL-C;
- Os grupos que receberam dieta padrão acrescida de torta de bixina não apresentaram diminuição da AST;
- Observamos uma tendência de aumento da atividade da catalase no grupo CB15.

Nos grupos que receberam dieta hipercolesterolemiantes mais tratamentos:

- Nossa dieta hipercolesterolemiantes foi efetiva ao aumentar os níveis séricos de colesterol total;
- A torta de bixina aumentou os níveis séricos de colesterol total, HDL-C, colesterol não HDL, o colesterol total no fígado e o peso do fígado nos animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes acrescidas de torta de bixina nas duas concentrações utilizadas;
- Observamos uma diminuição da AST nos animais que receberam dieta hipercolesterolemiantes acrescidas com torta de bixina nas duas concentrações;
- A atividade da paraoxonase foi diminuída nos grupos CCh, CB15 e CB75;
- Observamos uma tendência de aumento da atividade da catalase nos grupos HCh e HB15.

- Os tratamentos utilizados não afetaram a concentração de glicose, albumina e proteínas.

Nos grupos que receberam dieta padrão e hipercolesterolemia mais tratamentos:

- Os níveis de triacilgliceróis no grupo CB15, CB75 e HB75 foram diminuídos;
- Observamos um aumento da ALP no grupo CB15 e HB75 e uma diminuição no grupo CCh;
- Observamos uma tendência à diminuição na concentração de triacilgliceróis no fígado dos animais que receberam dieta padrão e hipercolesterolemia mais os tratamentos com torta de bixina;
- Os tratamentos não afetaram o peso dos rins, mas os animais dos grupos CCh, CB15, CB75 e HB75 apresentaram um aumento da concentração sérica de creatinina;
- O tratamento com torta de bixina aumentou a concentração de sulfidrilas ligadas a proteínas em 50% nos grupos CB15 e CB75;
- O tratamento com torta de bixina reduziu a concentração de sulfidrilas ligadas a proteínas em 30% no grupo HB75 e 50% no grupo HB15.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

ABRASS, C. K. (2004) Cellular lipid metabolism and the role of lipids in progressive renal disease. *Am J Nephrol*, 24; 46-53.

ALEXANDER, R.R., GRIFFITHS, J.M., WILKINSON, M.L. (1984). Basic Biochemical Methods. p. 241, John Wiley & Sons New York.

ALVAREZ-LEITE, J. I., OLIVEIRA, D. R.; PELUZIO, M. C. G. (2003). Dislipidemias. In: NETO, F. T. (Ed.) *Nutrição Clínica*, p.196-210, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

AUSTIN, M.A. (1999). Epidemiology of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *Am J Cardiol*, 83(9B): 13F-16F.

AVIRAM, M., ROSENBLAT, M., BISGAIER, C. L., NEWTON, R. S., PRIMO-PARMO, S. L. e LA DU, B. N. (1998). Paraoxonase Inhibits High-density Lipoprotein Oxidation and Preserves its Functions. *J. Clin. Invest.* 101, 1581-1590.

AVIRAM, M. (2004). Introduction to the serial review on paraoxonases, oxidative stress, and cardiovascular diseases, *Free Radical Biology & Medicine*, 37, 1301-1303.

AYUB, A., MACKNESS, M. L., ARROL, S., MACKNESS, B., PATEL, J. e DURRINGTON, P. N. (1999). Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2, 330-335.

BACHORIK, P.S., RIFKIND, B.M., KWITEROVICH Jr., P.O. (2000). Lipids and dyslipoproteinemia. *Clinical Chemistry*, 208-236.

BALIANE, A. (1982). A cultura do urucuzeiro. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do estado do Rio de Janeiro, p. 5-16, Niterói.

BALKAN, J.; DROGRU-ABBASOGLU, S.; AYKAÇ-TOKER, G.; UYSAL, M. (2004) The effect of a high cholesterol diet on lipids and oxidative stress in plasma, liver and aorta of rabbits and rats. *Nutrition Research*, v. 24, p. 229-234.

BATISTA, C. L.L.C. (1994). Produção e avaliação da estabilidade de corante hidrossolúvel de urucum, p 71, UFV, Viçosa.

BENDICH, A.(1994). Recent advances in clinical research involving carotenoids. *Pure & Appl. Chem*, 66(5): 1017-1024.

ROSSONI Jr., J.V.

BONORDEN, W. R. e PARIZA, M. W. (1994). Antioxidant nutrients and protection from free radicals. In: Kotsonis FN et al. *Nutritional Toxicology*, Raven Press, New York, p. 19-48.

BOREK. C. (2004) Dietary antioxidants and human cancer. *Integrative Câncer Therapies*, Thousand Oaks, v. 3, p. 333-341.

BOUVIER, F., DOGBO, O. & CAMARA, B. (2003). Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (Annatto). *Science*, vol. 300, 2089-2091.

BRAVO, E., CANTAFORA, A., CALCABRIM, A., ORFU, G. (1994). Why prefer the golden Syrian hamster to the Wistar rat in experimental studies on plasma lipoprotein metabolism? *Comp Biochem Physiol*.107B, 347-355.

BRAVO, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, v. 56, p. 317-333.

BRESSANI, R. (1983). Chemical Composition, Amino Acid Content and Nutritive Value of the Protein of the Annatto Seed (*Bixa Orellana*). *Arch Latinoameric. Nutr.* , 33: 2, 356-376.

BRODY, T. (1993). *Nutritional Biochemistry*. Academic press, p. 658, Londres.

BROWN, M. S. e GOLDSTEIN, J. L. (1980). Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J.Lipid Res.* 21(5), 505-517.

BROWN, M. S. e GOLDSTEIN, J. L. (1983). Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry*, Palo Alto, v. 52, p. 223-261.

BURTIS, C. A., ASHWOOD, E. R. (1998). Metabólitos nitrogenados e função renal. In: Tietz Fundamento de Química Clínica, 4ª Ed - Guanabara Koogan.

CAMPBELL, M. K. (2001). *Bioquímica*. 3ª ed., p. 751, São Paulo: Artes Médicas Sul.

CARMENA, R., DURIEZ, P. e FRUCHART, J. C. (2004). Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation*, Dallas, v. 109, [suppl III]:III-2–III-7.

CARVALHO, P. R. N., HEIN, M. (1989). Urucum – Uma fonte de corante natural. *Coletânea ITAL*, 19 (1), 25-33, Campinas

CARVALHO, P. R. N. (1992). Potencialidade dos corantes naturais. *Revista Brasileira de Corantes Naturais*. v. 1, n. 1, p. 244-245.

ROSSONI Jr., J.V.

- CASTRO, M.S. (1992). Influência das variáveis operacionais no processo de secagem de urucum. Monografia DEQ/UFPA, Belém, p. 90, 1992 apud SILVA, G. F. (1999). Extração de pigmentos de urucum com CO₂ supercrítico. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos, Engenharia de Alimentos/FEA/Unicamp, Campinas.
- CHAMPE, P.C., HARVEY, R.A. (2002). Metabolismo de Colesterol e Lipídios e Metabolismo dos Lipídios da Dieta. *Bioquímica Ilustrada*. Brazil: Artmed. 211-234; 169-176, Porto Alegre.
- CHAUDHRY, Y. (2003). Carotenoids- Natural Food Colors and Health Benefits-Symposium 12- Interaction of Natural Colors with Other Ingredients.
- CHEN, W.; MATUDA, K.; NISHIMURA, N.; YOLOGOSHI, H. (2004). The effect of taurine on cholesterol degradation in mice fed a high-cholesterol diet. *Life Sciences*, v. 74, p. 1889-1898.
- CHIANG, J. Y. (2004). Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J.Hepatol.*, 40(3), 539-551.
- COLLINS, P. (1992). The role of Annatto in food colouring. *Food ingredients & Processing International*, 23-27.
- COLLINS, P. e DOWNHAM, A. (2000). Colouring our Food in the Last and Next Millennium. *Journal of Food Science and Technology*, 35, 5-22.
- CONTO, W. L. do; OLIVEIRA, V. P.; CARVALHO, P. R. N.; GERMER, S. P. M. (1991). Estudos econômicos de alimentos processados. p. 65, ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas.
- COOPER, A. D. (1997). Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res*, 38:2173-92.
- COOPER, J. A., MULLER, G. J. and HUMPHRIES, S. E. (2005). A comparison of the PROCAM and Framingham point-scoring systems for estimation of individual risk of coronary heart disease in the Second Northwick Park Heart Study. *Atherosclerosis*, v. 181, p. 93-100.
- CUEN, M.P.S., BACERRA, R. (2003). Biodiversitas, El Achiote, Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Año 7, no 46, 7-11.
- DELGADO-VARGAS, F., JIMENEZ, A. R., e PAREDES-LÓPEZ, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains – characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 40 (3), 173-289.

ROSSONI Jr., J.V.

DE PAULA, H.; HARAGUCHI, F. K.; SILVA, R. C. P.; ROSSONI JR, J. V.; SILVA, L. S.; PEDROSA, M. L.; SILVA, M. E. (2005). Efeito hipocolesterolêmico de um extrato aquoso de urucum (*Bixa orellana*) em ratos hipercolesterolêmicos. Anais do I Congresso Mineiro de Alimentação e Nutrição. 5-5-2005, Ouro Preto.

DE PAULA, H.; HARAGUCHI, F. K., SILVA, R. C. P.; PEDROSA, M. L.; SILVA, M.E. (2005). Avaliação do efeito de um extrato aquoso de urucum (*Bixa orellana*) em hamsters hipercolesterolêmicos. Anais do I Congresso Mineiro de Alimentação e Nutrição. 5-5-2005, Ouro Preto.

DI MASCIO, P.; DEVASAGAYAM, T. P.; KAISER, S.; SIES, H. (1990). Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochem. Soc. Trans.* 18: 1054-1056.

DURRINGTON, P. N., MACKNESS, B., MACKNESS, M. I. (2001). Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb.* 21, 473-480.

DURRINGTON, R (2003). Dyslipidemia. *Lancet*, 362, 717-731.

EATON, J. W. (1991). Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. *J. Lab. Clin. Med.* 118, 3-4.

FANG, Y.; YANG, S.; WU, G. (2002). Free radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition.* 18: 872-879.

FARIA, L. J. G. (1998). Análise experimental do processo de secagem de urucum (*Bixa orellana* L.) em leito fixo. Tese de doutorado em Engenharia Química, FEA/Unicamp, Campinas, 1998 apud SILVA, G. F. (1998). Extração de pigmentos de urucum com CO₂ supercrítico. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos, Engenharia de Alimentos/FEA/Unicamp, Campinas.

FERNANDES, A. C. S, ALMEIDA, C.A., ALBANO, F., LARANJA, G.A.T., FELZENSZWALB, I., LAGE, C.L.S., SÁ, C.C.N.F.de, MOURA, A.S., KOVARY, K. (2002). Norbixin ingestion did not induce any detectable DNA breakage in liver and kidney but caused a considerable impairment in plasma glucose levels of rats and mice. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 13: 411-420.

FIELDING, C.J; FIELDING, P.E. (1995). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*, 36: 211-28.

FONTANA, J. D., MENDES, S.V., PERSIKE, D.S. PERACET, L. F., PASSOS, M. (1997). Carotenóides Cores Atraentes e Ação Biológica. Disponível em <<http://www.herbario.com.br/dataherb06/1112carotenoid.htm>>. Consultado em 6 /10/ 2007.

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L. F. PASSOS, M. (2000). Carotenóides. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 13, p. 40-45.

FREI, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 97: 5S-13S.

GALINDO-CUSPINERA, V., LUBRAN, M.B., RANKIN, S.A. (2002). Comparison of Volatile Compounds in Water- and Oil-Soluble Annatto (*Bixa orellana* L.) Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, vol 50, nº 7, 2010-2015.

GIULIANO, G, ROSATI, C. e BRAMLEY, P. M. (2003). To Dye or Not to Dye: Biochemistry of Annatto Unveiled, *Trends in Biotechnology*, vol. 21, n.12, 513-516.

GOLDBERG, I.J. (1996). Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein meta-bolism and atherogenesis. *J Lipid Res*, 37: 693-707.

GOTTO, A. M.; BRINTON, E. A. (2004). Assessing low levels of high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*, v.43, p. 717-724.

GOTTO, A. M. (2003). Antioxidants, statins, and atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, v.41, p. 1205-1210.

HALLIWELL, B e GUTTERIDGE, J. M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*, 246: 501-14.

HALLIWELL B et al. (1992). Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*, 119: 598-620.

HALLIWELL, B. (1993). The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*, 23 (1): 118-26.

HALLIWELL B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet*, 344: 721-724.

HALLIWELL, B e GUTTERIDGE, J. M. (1999). Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, Oxford.

HAYES, K. C., KHOSLA, P., KAISER, A. (1992). Dietary fat and cholesterol modulate the plasma lipoprotein distribution and production of pigment or cholesterol gallstones in hamsters. *J Nutr*, 122, 374-384.

HOENICKA, M. (1999). Ellman Assay. Disponível em: <www.mhoenicka.de/software/sgml/sop/ellman.pdf>, UT Houston Medical School. 12-7-2005.

ROSSONI Jr., J.V.

ITO, N., FUKUSHIMA, S., HASEGAWA, A., SHIBATA, M. & OGISO, T. (1983). Carcinogenicity of buthylated hydroxy anisole in F344 rats. *J The National Cancer Institue*. 27:1-4.

JACOB, R. A. (1995). The integrated antioxidant system. *Nutr Res* 15: 755-766.

JAKO, C.; COUTU, C. ;ROEWER,I.; REED, D. W. PELCHER, L.E.; COVELLO, P. (2002). S. Probing Carotenoid Biosíntese in Developing Deed Coats of *Bixa Orellana* (Bixaceae) Through Expressed Sequence Tag Analysis. *Plant Science*, 163, 141-145.

JAHROMI, F., RAY, A. B. e CHANSOURIA, J. P. N. (1993). Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Pterocarpus marsupium*. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v. 56, p. 989-994, 1993.

JAVITT, N. B. (2002). Cholesterol, hydroxycholesterols, and bile acids. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 292(5), 1147-1153.

JECFA (1982). Evaluation of certain food additives and contaminants. Twenty-sixth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Technical Report series No. 683.

JOLY, A. B. (1993). Botânica: introdução à taxonomia vegetal. Ed. Nacional, p. 777. São Paulo

JORDÃO Jr., A. A., CHIARELLO, P. G., BERNARDES, M. S. M. e VANNUCCHI, H. (1998). Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutationa reduzida e da vitamina E. *Medicina, Ribeirão Preto*, 31: 434-449.

KÄHKÖNEN, M. P., HOPIA, A. I. and HEINONEN, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 4076-4082.

KARRER, P. e JUCKER, E. (1950). Carotenoids. *Elsevier Publishing Company, Inc.* 384.

KINSELLA, J.E., FRANKEL, E., GERMAN, B. e KANNER, J. (1993). Possible mechanism for the protective role of the antioxidant in wine and plant foods. *Food Technology*.47:85-89.

KIOKIA, S. e GORDON, M. (2003). Antioxidant properties of annatto carotenoids. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 83, 523-529.

KLAUSEN, I.C; SJOL, A; HANSEN, O.S. (1997). Apolipoprotein (a) isoforms and coronary heart disease in men. A nested case-control study. *Atherosclerosis*, 132: 77-84.

KLEINMAN, D. e RICHIE, J. P. (2000). Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. *Biochem Pharmacol.* 60:19-29.

ROSSONI Jr., J.V.

KOWALA, M. C. (1993). Effects of an atherogenic diet on lipoprotein cholesterol profile in the F₁B hybrid hamster. *Atherosclerosis*, 103, 293-294.

KUHN, H.A., LASCH, H.G. (1977). Avaliação Clínica e Funcional do Doente. Editora da Universidade de São Paulo, p.291, São Paulo.

KWITEROVICH Jr, P.O. (2000). The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *Am J Cardiol*, 86(12A):5L-10L.

LAI, L.S., CHOU, S.T. e CHAO, W. W. (2001). Studies on the antioxidant activities of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. *J Agricultural and Food Chemistry*. 49:963-968.

LIMA, A. O., SOARES, J.B., GRECO, J.B., GALIZZI, J., CANÇADO, J.R. (1985). Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica – Técnica e Interpretação, 6^a ed., Guanabara Koogan.

LIMA, L. R. P. (2001). Efeitos farmacológico, toxicológico e mecanismo de ação dos flavonóides e corantes naturais extraídos do urucum (*Bixa orellana*) no metabolismo lipídico de coelhos. P. 122, UFV, Viçosa.

LIMA, L. R. P., OLIVEIRA, T. T., NAGEM, T. J., PINTO, A. S., STRINGHETA, P. C., TINOCO, A. L. A., SILVA, J. F. (2001). Bixina, Norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 196-200.

LIMA, L. R. P., OLIVEIRA, T. T., NAGEM. (2003). Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. *Rev. Nutr.*, 16 (3):305-314.

LIMA, L. R. P., OLIVEIRA, T. T., NAGEM, T. J., PINTO, A. S., LIMA, E. Q. e SILVA, J. F. (2003). Toxicidade Aguda de Rutina e de *Bixa orellana*, *Acta Farm. Bonaerense*, 22 (1), 21-26.

LIMA, R. O. A.; AZEVEDO, L.; RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. (2003). *Food Chem. Toxicol.* 41, 189

LUSIS, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, London, v. 407, p. 233-241.

MAGALHÃES, M.E.C; FREITAS, E.V.; POZZAN, R.; BRANDÃO, A.P. (2004). Novas perspectivas no tratamento de dislipidemias. *Rev da SOCERJ*, 105-111.

MAHFOUZ, M.M., KUMMEROW, F.A. (2000). Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *Journal Nutrition Biochemical*, 11: 293-302.

ROSSONI Jr., J.V.

MARMION, D. M. (1991). Handbook of U. S. Colorants: Foods, Drugs, Cosmetics, and Medical Devices. Third Edition, USA, 120-122.

MARTINEZ, T. L. R.; LOPES, A. C. (2004). *Dislipidemias: da teoria à prática*. 9. ed., p. 416, Atheneu, São Paulo.

MAY, P.H., ROCHA, R.B., SILVA, O.P., WAGNER, P.D., SILBEERLING, L. UNITED CONFERENCE ON TRADE AND DEVELOPMENT-17/dec/1997 - Management of Commodity Resource in the Context of Sustainable Development - A Survey of Environmentally Friendly Products of Brazil, pags.:8, 33-36.

MCINTYRE, N. e HARRY, D.S. (1991). Clinical disorders of plasma lipid and lipoprotein metabolism. In: McIntyre N, Harry DS, eds. Lipids and Lipoproteins in Clinical Practice. London: Wolfe Publishing , 93-139.

MERCADANTE, A. Z., STECK A. e PFANDER H. (1997). Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. 45, (4) 1050-1054.

MERCADANTE A. Z., STECK A. e PFANDER H. (1999). Three Minor Carotenoids from Annatto (*Bixa orellana*) Seeds. *Phytochemistry*. 52, (1) 135-139.

MEYDANI, M., MARTIN, A., RIBAYA-MERCADO, J., GONG, J., BLUMBERG, J. B. and RUSSEL, R. M. (1994). β -Carotene supplementation increases antioxidant capacity of plasma in older women. *Journal of Nutrition*, v. 124, p. 2397-2403.

MOGHADASIAN, M.H. (2002). Experimental atherosclerosis: A historical overview. *Life Sciences*, v.70, p.855-865.

MOTTA, V. T. (2003). Bioquímica clínica para o laboratório: Princípios e interpretações, p. 419. Editora Médica Missau, Caxias do Sul.

MULLENIX, P. S., ANDERSEN, C. A. e STARNES, B. W. (2005). Atherosclerosis as inflammation. *Annals of Vascular Surgery*, v. 19, p. 130-138.

NAJAR, S. V., BOBBIO, F. O. e BOBBIO, P. (1988). Effects of light, air, anti-oxidants and pro-oxidants on Annatto extracts (*Bixa orellana*). *Food Chemistry*, 29, nº 4, 283-289.

NIKI, E. (2004). Antioxidants and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, v. 32, p. 156-159.

NISTOR, A., BULLA, A., FILIP, D. A., RADU. (1987). The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 68, 159-173.

ROSSONI Jr., J.V.

OLIVEIRA, T. T, NAGEM, T. J., PEREIRA, W. L., PINTO, A. S., STRINGHETA, P. C. (2001). Hypolipidemic and synergic effects of naringinin, chrolophyl and monascus in rats (*Ratus norvicus*). *Aliment Nutr*, 12:95-102.

PAREJO, I., VILADOMAT, F., BASTIDA, J., ROSAS-ROMERO, A., FLERLAGE, N., BURILLO, J. e CODINA, C. (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, p. 6882-6890.

PASQUALUCCI, C. A.; UINT, L.; LAGE, S. G. (1999). Parte I: fenômenos celulares na aterosclerose. *Revista Brasileira de Cardiologia*, v. 1, n. 1.

PAUMGARTTEN, F. J. R.; DE-CARVALHO, R. R.; ARAÚJO, I. B.; PINTO, F. M.; BORGES, O. O.; SOUZA, C. A. M.; KURIYAMA, S. N. (2002). *Food Chem. Toxicol.* 40, 1595.

PIKULEVA, I. A. (2006). Cholesterol-metabolizing cytochromes P450. *Drug metabolism and disposition*. 34, 513–520.

PEASE, R.J; LEIPER, J.M. (1996). Regulation of hepatic apolipoprotein-B-containing lipo-protein secretion. *Curr Opin Lipidol*, 7: 132-8.

PRYOR, W. A. (1991). The antioxidant nutrient and disease prevention: What do we know and what do we need to find out? *Amer J Clin Nutri* 53:391-393.

PUSKA, P.; KOPERLAINEN, V.; HOIE, L. H.; SKOVLUND, E.; LAHTI, T.; SMERUD, K. T. (2002). Soy in hypercholesterolaemia: a double-blind, placebo-controlled trial. *European Journal of Clinic Nutrition*, v.56, p. 352-357.

QING, S.U, ROWLEY, K. G. e BALAZS, N. D. H. (2002). CAROTENOIDS: Separation Methods Applicable to Biological Samples, *Journal of Chromatography B*, 781, 393-418.

REDINGER, R. N. (2003). The coming of age of our understanding of the enterohepatic circulation of bile salts. *Am J Surg*. 185(2), 168-172.

REEVES, P. G., NIELSEN, F. H. e FAHEY, G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutrition*, 123 (11), 467-472.

RODRIGUES, F. C. Efeito de naringenina, bixina, leites de vaca e cabra e extrato hidrossolúvel de soja sobre o metabolismo lipídico de coelhos (2003). Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa.

ROSSONI Jr., J.V.

ROSSONI Jr., J.V., ABUJAMRA, C., SILVA, L.S., DE PAULA, H., PEDROSA, M.L., SILVA, R.C.P., SILVA, M.E. (2005). Efeitos do tratamento com chá do urucum sobre parâmetros relacionados ao metabolismo de colesterol em ratos hipercolesterolêmicos. *Anais do I Congresso Mineiro de Alimentação e Nutrição*. 5-5-2005, Ouro Preto.

RUSSELL, D. W. (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu.Rev.Biochem.* 72, 137-174.

SANTOS, R. D.; PEREIRA, A.; NETO, A. A.; SOUZA, A. D.; AVEZUM A.; FALUDI, A. A.; SPÓSITO, A. C.; LOURES-VALE A. A.; LOTTENBERG, A. M.; CHAGAS, A. C. P.; MANSUR, A. P.; GUIMARÃES, A.; DUNCAN, B.; CAMELLI, B.; CARVALHO, C. C.; POLANCZYK, C.; SCHERR, C. ; ARMAGANIJAN, D. ; DANTE, M.G.; QUINTÃO, E.; MELLO, E. P.; NAKANDAKARE, E.; OPPI, E.; COTTA, E. F.; JANOVICH, E.; MORIGUCHI, E.; FONSECA, F. H.; PICHETH, G. ; DIOGUARDI, G.; ROSITO, G.; XAVIER, H. T.; LOPES, I. L.; CRUZ, I.; ISSA, J. S.; DIAMENT, J.; RAMIRES, J. F. A.; BASQUES, J. C.; LIMA, J. C.; NICOLAU, C.; KRIEGER, J. E.; SANTOS, J. E.; GALVÃO, J. J.; ALDRIGHI, J. A; NOVAZZI, J. P.; ALMEIDA, L. P.; BRICARELLO, L. P.; RABELO, L.; UINT, L.; CÉSAR, L. M. C.; BODANESE, L. C.; INTROCASO, L.; IZAR, M. C.; MAGALHÃES, M. C.; CATELLI, M. H.; SCARTEZINI, M.; BERTOLAMI, M. C.; MALACHIAS, M. C.; BATLOUNI, M.; GHORAYEB, N.; CLAUSELL, N.; FORTI, N.; GARCIA, F. S. ; GEBARA, O.; COELHO, O. C.; LUZ, P. L.; MARANHÃO, R. C.; STEIN, R.; PERIM, R. C.; GIANNINI, S. D.; KAISER, S.; IHARA, S.; MARTINEZ, T.; CARVALHO, T.; FILHO, W. S. (2001). III Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 77, p.1-48.

SANTOS, R.D e MARANHÃO, R.C. (2000). Importância da lipoproteína (a) na aterosclerose. *Rev Soc Cardiol do Estado de São Paulo*, 10: 723-7.

SCALBERT, A., JOHNSON, I. T. e SALTMARSH, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 81, p. S215-217.

SCOTT, M. D., LUBIN, B. H., ZUO, L., KUYPERS, F. A. (1991). Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J Lab Clin Med*, 118: 7-16.

SCOTT, J. (2004). Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 14, p. 271-279, 2004.

SENTI, M, TOMAS M, FITO M, WEINBRENNER T, COVAS MI, SALA J, MASIA R, MARRUGAT J. (2003). Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:5422–5426.

ROSSONI Jr., J.V.

SHIH, D. M., GU, L., HAMA, S., XIA, Y. R., NAVAB, M., FOGELMAN, A. M. e LUSIS A. J. (1996). Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J. Clin. Investig.* 97:1630–1639.

SHIH, M. J., ; YANG, H.; MOTLEY, E. D. E GUO, Z. M. Overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase and/or catalase in mice inhibits aorta smooth muscle cell proliferation. *Am J Hypertens*, 17: 450-456, 2004.

SILVA, C. R.; GREGGI ANTUNES, L. M.; BIANCHI, M. L. (2001). Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol.Res.* 43: 561-566.

SILVA, L.S.; ROSSONI Jr, J.V.; ABUJAMRA, C.; DE PAULA, H.; PEDROSA, M. L.; SILVA, M.E. (2005). Efeitos do tratamento com a bixina oleosa (P.A. lipo 8%) sobre parâmetros relacionados ao metabolismo de colesterol em ratos hipercolesterolêmicos. Anais do I Congresso Mineiro de Alimentação e Nutrição. 5-5-2005, Ouro Preto.

SILVA, M. E., DE PAULA, H., ANSALONI, J. A., e CHAVES, C. R. C. (2000). Efeito do chá de Urucum (*Bixa orellana*) sobre parâmetros do metabolismo de lipídios em ratos. Simpósio Sul Brasileiro de Alimentação e Nutrição: História, Ciência e Arte. Ref Type: Conference Proceeding. Florianópolis, 231-235.

SIMA, A., STANCU, C., CONSTANTINESCU, E., OLEGEANU, L. e SIMIONESCU, M. (2001). The hyperlipemic hamster - a model for testing the antiatherogenic effect of amlodipine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Bucharest, v. 5, p. 153-162.

SOUZA, E.C.G. Efeitos de Bixina sobre os Parâmetros Bioquímicos Séricos em Ratos. (2001). Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

SPADY, D. K. e DIETSCHY, J. M. (1983). Sterol synthesis *in vivo* in 18 tissues of the squirrel monkey, guinea pig, rabbit, hamster, and rat. *Journal of Lipid Research*, v. 24, p. 303-315.

STAHL, W. e SIES, H. (1996). Lycopene: a biological important carotenoid for humans? *Arch Biochem Biophys*, 331(1), 1-9.

STOCKER, R; KEANEY, J.F.Jr. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*, 84(4):1381-1478.

SUBBA RAO, D., SEKHARA, N. C., SATYANARAYANA, M. N., SRINIVASAN, M. (1970). Effect of curucumin on serum and liver cholesterol levels in the rat. *Journal of Nutrition*, v. 100, p. 1307-1316.

ROSSONI Jr., J.V.

SUCKLING, K. E., BENSON, G. M., BOND, B., GEE, A., GLEN, A., HAYNES, C. e JACKSON, B. (1991). Cholesterol lowering and bile acid excretion in the hamster with cholestyramine treatment. *Atherosclerosis*, v. 89, p. 183-190.

SURESH BABU, P. S., SRINIVASAN, K. Hypolipidemic action of curucumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in streptozotocin induced diabetic rats. *Molecular and cellular biochemistry*, v. 166, p. 169-175, 1997.

TALL, A. R. (1993). Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res*, 34: 1255-74.

TRAUTWEIN, E. A., LIANG, J., HAYES, K. C. (1993a). Plasma lipoproteins, biliary and bile acid profile differ in various strains of Syrian hamsters *Mesocricetus auratus*. *Comp Biochem Physiol*, 104A, 829-835.

TRAUTWEIN, E. A., SIDDIQUI, A., HAYES, K.C. (1993b). Modeling plasma lipoprotein-bile lipid relationships: differential impact of psyllium and cholestyramine in hamsters fed a lithogenic diet. *Metabolism*, 42(12), 1531-1540.

XAVIER, H. T., ABDALLA, D. S. P., MARTINEZ, T. L. R., RAMIREZ, J. A. F. e GAGLIARDI, A. R. T. (2004). Effects of oxidized LDL in *in vitro* proliferation and spontaneous motility of human coronary artery endothelial cells. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, São Paulo, v. 83, p. 493-497.

WEISS, J. F e LANDAUER, M. R.. (2003). Protection Against Ionizing Radiation by Antioxidant Nutrients and Phytochemicals. *Toxicology*, 189, 1-20.

WOLTERS, H., ELZINGA, B. M., BALLER, J. F., BOVERHOF, R., SCHWARZ, M., STIEGER, B., VERKADE, H. J. e KUIPERS, F. (2002). Effects of bile salt flux variations on the expression of hepatic bile salt transporters in vivo in mice. *J Hepatol*. 37(5), 556-563.

ZAGER, R. A., ANDOH, T., BENNETT, W. M. (2001). A durable response after acute and subacute renal insults. *Am J Pathol*, 159; 743-752.

ZAMAN, A.G.; HELFT, G.; WORTHLEY, S.G.; BADIMON, J.J. (2000). The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 149: 251-66.

ZHANG, L. X.; COONEY, R. V.; BERTRAM, J. S. (1991). Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis*, 12: 2109-2114.

ZHENG, W. e WANG, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agricultural and Food*. 49:5165:5170.