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

LORENA SOUZA E SILVA

# AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NUTRICIONAIS E DO ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS TRATADOS COM EXTRATO OLEOSO DE BIXINA (P.A. LIPO 8%)

Ouro Preto
2009

S586a Silva, Lorena Souza e.
Avaliação de parâmetros bioquímicos nutricionais e do estresse oxidativo em ratos tratados com extrato oleoso de bixina (P.A. Lipo 8%) [manuscrito] / Lorena Souza e Silva. - 2009.
xxi, 136f.: il., grafs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva.

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. Hipercolesterolemia - Teses. 3. Estresse oxidativo - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 612.397

Catalogação: sisbin@sisbin.ufop.br

LORENA SOUZA E SILVA

# AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NUTRICIONAIS E DO ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS TRATADOS COM EXTRATO OLEOSO DE BIXINA (P.A. LIPO 8%)

*Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação do Núcleo de Pesquisas 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.Drº. Marcelo Eustáquio Silva*
*Co-orientador: Profª. Drª Maria Lúcia Pedrosa*

Ouro Preto
2009

# DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Zilda** e **Geraldo**, e à minha irmã **Renata**, pelo amor e incentivo constantes, este trabalho é dedicado a vocês.

# AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço ao Prof. Drº Marcelo Eustáquio Silva e à Profª. Drª. Maria Lúcia Pedrosa, a orientação e os ensinamentos imprescindíveis para a realização deste trabalho. Agradeço a confiança creditada a mim e a oportunidade de aprender com vocês.

MUITO OBRIGADA

# AGRADECIMENTOS

Á Deus por estar sempre comigo, me iluminando, guiando os meus passos e me dando sabedoria para seguir em frente;

Aos meus pais POR TUDO. Agradeço por todos os esforços que fizeram para que eu pudesse realizar os meus sonhos. Obrigada por sempre acreditarem e apostarem em mim.

Á minha irmã Renata pela cumplicidade, pelo apoio, conselhos e risadas;

Á minha família, que mesmo a distância torceu por mim;

Á todos do Laboratório de Nutrição Experimental que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, obrigada pelo convívio e colaboração. Muito obrigada ao técnico Jair, e aos amigos Joamyr, Fabrício, Bruno, Maísa, Melina, Larissa, Joyce, Herberth, Fabiano, Leandro, Fernanda, Rogério, Sandra, Wanda, Aleçandra, Emerson, Laura, Flávia e Aline.

Aos colegas da Pós Graduação e á Maria Aparecida "Cida" por toda ajuda durante o mestrado;

Ás minhas "amigas- irmãs" Neliane e Jane pela amizade que começou na graduação e que é sempre muito importante pra mim;

Ao meu amigo Joamyr por sempre me dar forças e ouvir meus desabafos;

Á República Tchu Tchu Tchu, o meu segundo lar! Obrigada a todas pelos momentos únicos e inesquecíveis que vivi aqui em Ouro Preto. AMO VOCÊS !!!!!

# SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS……..……..…..……...IX
LISTA DE FIGURAS.....XI
LISTA DE TABELAS.....XII
LISTA DE QUADROS.....XVI
LISTA DE ANEXOS.....XVII
RESUMO.....XVIII
ABSTRACT.....XX
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....3
2.1 - Alimentos funcionais.....3
2.2 – Urucum.....7
2.2.1 - Etnobotânica e Taxonomia.....7
2.2.2 - Uso do urucum como corante.....9
2.2.3 - Produção de grãos e produtos derivados do urucum.....10
2.2.4 - Composição e propriedades do urucum.....11
2.2.5 - Principais substâncias do urucum.....13
2.2.5.1 - Bixina: propriedades toxicológicas, hipocolesterolemiantes e sobre o estresse oxidativo. .....16
2.2.5.1.1 - Propriedades toxicológicas.....16
2.2.5.1.2 - Propriedades hipocolesterolêmicas.....17
2.2.5.1.3 - Propriedades sobre o estresse oxidativo.....18
2.3 - Metabolismo das lipoproteínas.....20
2.4 - Dislipidemias.....23
2.5 - Aterosclerose.....25
CAPÍTULOS 3 – OBJETIVOS.....29
3.1 - Objetivo Geral.....29
3.2 - Objetivos Específicos.....29
CAPÍTULO 4 – MATERIAL E MÉTODOS.....30
4.1 - Animais e divisão dos grupos.....30
4.2 - Dietas.....30
4.3 - Experimentos.....31
4.3.1 - Desenho experimental específico do experimento 1.....31
4.3.2 - Desenho experimental específico do experimento 2.....32
4.3.3 - Desenho experimental específico do experimento 3.....33
4.4 - Obtenção do soro e plasma.....33
4.5 - Dosagens Bioquímicas.....34
4.5.1 - Protocolo de dosagem de Paraoxonase.....34
4.5.1.1 - Paraoxonase – Atividade arilesterase.....34
4.5.1.2 - Paraoxonase – Atividade paraoxonase.....35
4.5.2 - Protocolo de dosagem dos grupos sulfidrilas.....36
4.5.2.1 - Procedimento de dosagem de sulfidrilas totais.....37
4.5.2.2 - Procedimento de dosagem de sulfidrilas livres.....38
4.5.2.3 - Cálculos para determinação das concentrações de sulfidrilas totais, livres e ligadasà proteínas.....38
4.6 – Extração de gordura do fígado e das fezes.....38

4.7 – Dosagem de colesterol total e triacilgliceróis na gordura do fígado.....39
4.8 – Dosagem de colesterol total e triacilgliceróis na gordura das fezes.....39
4.9 - Análise Estatística.....40
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS.....41
5.1) Resultados do experimento 1.....41
5.1.1) Avaliação nutricional.....41
5.1.2) Peso dos órgãos.....42
5.1.2.1) Pesos total e relativo dos rins e do baço.....42
5.1.2.2) Pesos total e relativo do fígado e da gordura abdominal.....43
5.1.3) Perfil lipídico.....44
5.1.3.1) Perfil lipídico sérico.....44
5.1.3.2) Perfil lipídico hepático e fecal.....45
5.1.4) Parâmetros relacionados ao metabolismo hepático e renal.....46
5.1.5) Defesas antioxidantes.....48
5.1.6) Glicose, proteínas totais e albumina.....48
5.2) Resultados do experimento 2.....50
5.2.1) Avaliação nutricional.....50
5.2.2) Peso dos órgãos.....51
5.2.2.1) Pesos total e relativo dos rins e do baço.....51
5.2.2.2) Pesos total e relativo do fígado e da gordura abdominal.....52
5.2.3) Perfil lipídico.....53
5.2.3.1) Perfil lipídico sérico.....53
5.2.3.2) Perfil lipídico hepático.....54
5.2.3.3) Perfil lipídico fecal.....55
5.2.4) Parâmetros relacionados ao metabolismo hepático e renal.....56
5.2.4.1) Parâmetros da função hepática.....56
5.2.4.2) Parâmetros da função renal.....57
5.2.5) Defesas antioxidantes.....58
5.2.5.1) Grupos sulfidrilas.....58
5.2.5.2) Paraoxonase.....59
5.2.6) Glicose, proteínas totais e albumina.....60
5.3) Resultados do experimento 3.....62
5.3.1)Avaliação nutricional.....62
5.3.2) Peso dos órgãos.....63
5.3.2.1) Pesos total e relativo dos rins e do baço.....63
5.3.2.2) Pesos total e relativo do fígado e da gordura abdominal.....64
5.3.3) Perfil lipídico.....65
5.3.3.1) Perfil lipídico sérico.....65
5.3.3.2) Perfil lipídico hepático.....66
5.3.3.3) Perfil lipídico fecal.....67
5.3.4) Parâmetros relacionados ao metabolismo hepático e renal.....68
5.3.4.1) Parâmetros da função hepática.....68
5.3.4.2) Parâmetros da função renal.....69
5.3.5) Defesas antioxidantes.....70
5.3.5.1) Grupos sulfidrilas.....70
5.3.5.2) Paraoxonase.....71
5.3.6) Glicose, proteínas totais e albumina.....72

CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO.....74
CAPÍTULO 7 – CONCLUSÃO.....115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....118

# LISTA DE SIGLAS

**AC** - Ácido cólico

**ACAT** - Colesterol aciltransferase

**AACC** - American Association of Cercal Chemists

**ACDC** - Ácido quenodeoxicólico

**AIN** - American Institute of Nutrition

**ALP** - Fosfatase Alcalina

**ALT** - Alanina aminotransferase

**AMP** - Adenosina monofosfato

**ANOVA** - Análise de variância

**ANVISA** - Agência de Vigilância Sanitária

**AOAC** - Association of Official Agricultural Chemists

**AST** - Aspartato aminotransferase

**C** - Grupo de animais que receberam dieta padrão

**CBO** - Dieta padrão contendo extrato oleoso de bixina

**CETEP** – Proteínas transferidoras de éster de colesterol

**Cn-HDL** - Colesterol não HDL

**DEN** - N – dietilnitrosamina

**DTNB** - 5,5-ditio-bis-2-nitro-benzóico

**EDTA** - Àcido etilenodiaminotetracético

**FOSHU** - Foods for Specified Health

**GSH** - Glutationa reduzida

**GSSG** - Glutationa oxidada

**H** - Grupo de animais que receberam dieta hipercolesterolemiante

**HBO** - Dieta hipercolesterolemiante contendo extrato oleoso de bixina

**HDL** - Lipoproteínas de alta densidade

**HMG - CoA** - 3-Hidróxi-3metil-glutaril Côa

**IDA** – Ingestão diária aceitável

**IMC** - Índice de massa corporal

**LCAT** – Lecitina colesterol acil transferase

**LDL** - Lipoproteína de baixa densidade

**LDL-OX** - LDL modificada oxidativamente

**LDLR** - Receptores de LDLR

**MCP-1**-Proteína quimiotática para monócitos

**M-CSF** - Fator estimulador das colônias de monócitos

**MIC** - Concentração mínima inibitória

**MM-LDL-OX- LDL** - LDL minimamente oxidada

**MUFAs** - Ácidos graxos monoinsaturados

**PON** - Paraoxonase

**PUFAs** - Ácidos graxos poliinsaturados

**RNS** - Espécies reativas de nitrogênio

**ROS** - Espécies reativas de oxigênio

**RPM** - Rotações por minuto

**RXF** - Receptor X farnesóide

**RXL** - Receptor X hepático

**RXR** - Receptor X retinóide

**SREBPs** - Proteínas ligadoras de elementos de resposta a esteróis

**TCA** - Ácido tricloroacético

**TEA** - Cloreto de trietanolamina

**VLDL** - Lipoproteínas de densidade muito baixa

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotos de urucum.

Figura 2 - Estruturas moleculares da *cis* e *trans* bixina e *cis* e *trans* norbixina.

Figura 3 – Metabolismo de lipoproteínas

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais classes e características das lipoproteínas plasmáticas.

Tabela 2 - Massa corporal após adaptação às dietas, ingestão total, ganho de massa total e massa corporal final de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO,) dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 3 – Peso total e peso relativo (peso total do órgão / peso do animal) dos rins e do baço de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 4 – Peso total e peso relativo (peso total do órgão / peso do animal) do fígado e da gordura abdominal de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 5 - Concentrações séricas do colesterol total, colesterol HDL, colesterol não-HDL (Cn-HDL), relação HDL-Cn-HDL e triacilgliceróis de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 6– % de gordura hepática e fecal de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 7 – Atividades das enzimas séricas ALT, AST e ALP e concentração sérica da uréia de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 8 – Concentrações séricas de sulfidrilas totais, livres e ligadas às proteínas de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 9 – Concentrações séricas de glicose, proteínas totais e albumina de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 10 - Massa corporal inicial e após 15 dias de adaptação às dietas, ingestão total, ganho de massa total e massa corporal final de animais alimentados com dieta padrão

(C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 11 – Peso total e peso relativo (peso total do órgão / peso do animal) dos rins e do baço de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 12 – Peso total e peso relativo (peso total do órgão / peso do animal) do fígado e da gordura abdominal de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 13 - Concentrações séricas do colesterol total, colesterol HDL, colesterol não-HDL (Cn-HDL), relação HDL-Cn-HDL e triacilgliceróis de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 14 – Porcentagem de gordura hepática e concentrações de colesterol total e triacilgliceróis no fígado de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 15 – Porcentagem de gordura fecal e concentrações de colesterol total e triacilgliceróis nas fezes de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 16 – Atividade das enzimas séricas ALT, AST e ALP de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 17– Concentrações séricas de creatinina e uréia de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 18 – Concentrações séricas de sulfidrilas totais, livres e ligadas a proteínas de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 19 – Atividades arilesterase e paraoxonase da PON de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta

hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 20 – Concentrações séricas de glicose, proteínas totais e albumina de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 21: Massa corporal inicial e após 15 dias de adaptação às dietas, ingestão total, ganho de massa total e massa corporal de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 22 – Peso total e peso relativo (peso total do órgão / peso do animal) dos rins e do baço de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 23 – Peso total e peso relativo (peso total do órgão / peso do animal) do fígado e da gordura abdominal de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 24 – Concentrações séricas do colesterol total, colesterol HDL, colesterol não-HDL (Cn-HDL), relação HDL-Cn-HDL e triacilgliceróis de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 25 – Porcentagem de gordura hepática e concentrações de colesterol total e triacilgliceróis no fígado de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 26 – Porcentagem de gordura fecal e concentrações de colesterol total e triacilgliceróis nas fezes de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 27 – Atividade das enzimas séricas ALT, AST e ALP de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 28 – Concentrações séricas de creatinina e uréia de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta

hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 29 - Concentrações séricas de sulfidrilas totais, livres e ligadas a proteínas de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 30 - Atividades de arilesterase e paraoxonase da PON de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

Tabela 31 – Concentrações séricas de glicose, proteínas totais e albumina de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).

# LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Organização de substâncias bioativas em alimentos funcionais quanto à natureza química e molecular.

Quadro 2 - Classificação etnobotânica do urucuzeiro.

Quadro 3 - Composição das dietas experimentais utilizadas nos experimentos 1 e 2 (g/Kg de dieta).

Quadro 4 - Composição das dietas experimentais utilizadas no experimento 3 (g/Kg de dieta).

# LISTA DE ANEXOS

Anexo I - Laudo de análise do produto extrato oleoso de bixina P.A. Lipo 8%.

Anexo II – Protocolos das Dosagens Bioquímicas.

Anexo III – Resumo tabelado dos resultados dos experimentos 1, 2 e 3.

# RESUMO

O extrato de sementes de urucum, bastante utilizado como corante de alimentos, tem sido também descrito pela comunidade científica por seu efeito hipocolesterolemiante. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar em ratos, os efeitos da administração de um extrato oleoso contendo 8% de bixina sobre o perfil lipídico, defesas antioxidantes e marcadores das funções hepáticas e renais. Foram conduzidos três experimentos: no primeiro utilizamos ratos machos que recebiam dieta AOAC, no segundo utilizamos ratos fêmea que recebiam dieta AOAC e no terceiro utilizamos ratos fêmea que recebiam dieta AIN-93. Cada experimento teve a duração de oito semanas e em cada um deles foram utilizados 32 ratos Fisher, os quais foram distribuídos em quatro grupos: grupo controle (C), que recebeu dieta padrão (AOAC ou AIN-93), grupo H que recebeu dieta hipercolesterolemiante, grupo CBO que recebeu a dieta controle suplementada com o extrato oleoso de bixina e o grupo HBO que recebeu dieta hipercolesterolemiante suplementada como o extrato. Após o período experimental, amostras de sangue e tecido hepático foram coletadas e as dosagens bioquímicas realizadas.

Nossos resultados para o primeiro experimento indicaram que a associação de bixina à dieta hipercolesterolemiante reduziu as concentrações do colesterol total e não-HDL, bem como reduziu o índice aterogênico, a quantidade de gordura hepática e fecal e as atividades de ALT e AST dos animais do grupo HBO. A associação de bixina à dieta controle elevou as concentrações do colesterol HDL e reduziu atividade de AST dos animais do grupo CBO. A bixina exerceu efeito hipotrigliceridêmico, reduziu as concentrações de uréia e elevou a concentração dos grupos sulfidrilas totais e livres, além de elevar a atividade de ALP.

Os nossos resultados para o segundo experimento indicaram que a associação de bixina à dieta hipercolesterolemiante reduziu as concentrações do colesterol não-HDL, o índice aterogênico, as atividades de ALT e ALP, a quantidade de gordura hepática, bem como as concentrações de colesterol e triacilgliceróis hepáticos e fecais e a concentração de creatinina dos animais do grupo HBO. Esta mesma associação elevou as concentrações séricas do colesterol HDL e triacilgliceróis e as atividades arileterásica e paraoxonase da PON. A associação de bixina à dieta controle elevou a atividade de ALT e a

concentração de uréia e reduziu a concentração de creatinina e as atividades arielesterásica e paraoxonase da PON dos animais do grupo CBO. A bixina exerceu efeito hipocolesterolêmico e elevou a concentração de grupos sulfidrilas livres.

No terceiro experimento, os resultados indicaram que a associação de bixina à dieta hipercolesterolemiante elevou as concentrações do colesterol total e não-HDL, elevou o índice aterogênico, a quantidade de gordura fecal, os triacilgliceróis fecais e a atividade de ALP bem como reduziu a atividade paraoxonase da PON dos animais do grupo HBO. A associação de bixina à dieta controle elevou as concentrações do colesterol HDL, dos triacilgliceróis hepáticos, dos grupos sulfidrilas livres e a atividade arielterasásica da PON e reduziu a concentração sérica de creatinina dos animais do grupo CBO. A bixina exerceu efeito hipotrigliceridêmico e elevou as concentrações dos grupos sulfidrilas totais e ligados á proteínas.

Nas condições e modelos propostos, concluímos que o tratamento com bixina exerceu efeito hipocolesterolêmico nos experimentos 1 e 2 onde a dieta oferecida foi a AOAC. Por outro lado, observamos que o efeito hipocolesterolemiante induzido por este tratamento não foi observado no experimento 3 com a dieta AIN-93, sugerindo-nos que variações relacionadas à composição destas dietas possam estar influenciando a atuação da bixina sobre o metabolismo lipídico. Os experimentos indicaram ainda resultados satisfatórios quanto às propriedades antioxidantes da bixina e que as alterações dos marcadores das funções hepática e renal podem estar relacionados às variações particulares de cada experimento.

# ABSTRACT

The annato seeds extract used as a food colour has also been described by the scientific community by its hypocholesterolemic effect. Thus this work aimed at assessing in rats the effect of the administration of an oil extract containing 8% bixin on the lipid profile, antioxidant defenses and markers of hepatic and renal functions. Three experiments were conducted: in the first one male rats received the AOAC diet, in the second one female rats were fed the AOAC diet and in the third one female rats were given the AIN-93 diet. Each experiment lasted for eight weeks and in each one 32 Fisher rats were used which were divided into four groups: control (C) that received the standard diet (AOAC or AIN-93), H that received a hypercholesterolemic diet, CBO was given the standard diet supplemented with the oil extract of bixin and HBO that received the hypercholesterolemic diet supplemented with the extract. After the experimental period samples of blood and hepatic tissue were collected and biochemical determinations were performed.

Our results for the first experiment indicated that the association of bixin with the hypercholesterolemic diet reduced the concentrations of total and non-HDL cholesterol as well as reduced the atherogenic index, the amount of hepatic and fecal fat and the activities of ALT and AST in the animals of the HBO group. The association of bixin with the control diet raised the concentration of HDL-cholesterol and reduced the AST activity in the CBO animals. Bixin exerted a hypotriglyceridemic effect, reduced the concentration of urea and raised that of total and free sulphydryl groups besides increasing the ALP activity.

The results of the second experiment indicated that the association of bixin with the hypercholesterolemic diet reduced the concentrations of non-HDL cholesterol, the atherogenic index, the activities of ALT and ALP, the amount of hepatic fat, as well as the concentrations of cholesterol and hepatic and fecal triacylglicerols, and the concentration of creatinina in the HBO animals. This association increased the serum concentrations of HDL cholesterol and triacylglycerols and the arilesterasic and paraoxonase activities of PON. The association of bixin with the control diet increased the ALT activity and the concentration of urea and reduced the concentration of creatinina and the arilesterasic and paraoxonase activities of PON in the CBO rats.

Bixin exerted a hypocholesterolemic effect and raised the concentration of free sulphydryl groups.

In the third experiment the results indicated that the association of bixin with the hypercholesterolemic diet increased the concentrations of total and non-HDL cholesterol, raised the atherogenic index, the amount of fecal fat, the fecal triacylglicerols and the ALP activity, as well reduced the paraoxonase activity of PON of the HBO animals. The association of bixin with the control diet raised the concentrations of HDL, of hepatic triacylglicerols, of free sulphydryl groups and the arilesterasic activity of PON and decreased the serum concentration of creatinina of the CBO animals. Bixin exerted a hypotriglyceridemic effect and raised concentration of free and protein-bound sulphydryls groups.

In the proposed conditions and models we conclude that the treatment with bixin exerted a hypocholesterolemic effect in experiments 1 and 2 where the AOAC diet was offered. On the other hand we observed that the hypocholesterolemic effect induced by this treatment was not observed with the AIN-93 diet what suggests that the variations related to the composition of the diets might have influenced the action of bixin in the lipid metabolism. The experiments indicated also satisfactory results as for the antioxidant properties of bixin and that the alterations of markers of hepatic and renal functions may be related to the particular variations of each experiment.

# INTRODUÇÃO

# CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

O reconhecimento da hipercolesterolemia e estresse oxidativo como fator de risco para as doenças ateroscleróticas levou a uma busca por alimentos que fossem eficazes na redução dos níveis de colesterol e de radicais livres, além de um crescente entusiasmo sobre o uso de antioxidantes como agentes antiaterogênicos. Neste contexto, a utilização de plantas com fins medicinais vem contribuindo como um vasto campo de pesquisa e publicações, e a busca de novos fitoterápicos para minimizar os efeitos colaterais e os altos custos do tratamento medicamentoso têm sido cada vez mais comuns (Gonçalves et al., 2006).

*Bixa orellana*, conhecida por annato, achiote, ou urucum é uma árvore da família *Bixacea*, nativa da Floresta Tropical da América Central e do Sul (Felicissimo et al., 2004) cujas sementes são uma rica fonte de pigmentos vermelhos alaranjados que tem sido amplamente usado pela indústria de corantes de alimentos (Fernandes et al., 2002). Estas sementes são revestidas por uma camada de substâncias colorantes as quais podem ser obtidas por extração com solventes, como álcali ou óleo, ou por atrito mecânico (Shuhama et al., 2003), onde os principais pigmentos obtidos são bixina e norbixina (Preston e Rickard, 1980).

A literatura registra o efeito antioxidante dos carotenóides e sua importância na prevenção da aterosclerose. Sabe-se que a lipoproteína LDL, quando oxidada, danifica o endotélio, por conseguinte, a ação antioxidante dos carotenóides, nos quais se inclui a bixina e a norbixina, protegeria o endotélio da ação desta lipoproteína (Fontana et al., 2000).

Aproximadamente 80% dos pigmentos presentes nas sementes de urucum consistem do apocarotenóide bixina, um carotenóide atípico que possui um grupo carboxílico livre e um grupo carboxílico esterificado como grupos finais, o qual tem sido encontrado até o momento somente em *Bixa Orellana*. (Preston e Rickard, 1980; Mercadante et al., 1996).

Entre os carotenóides naturais a bixina é uma das mais efetivas supressoras biológicas de moléculas de oxigênio simpleto, podendo contribuir para a proteção das células e tecidos contra os efeitos deletérios dos radicais livres, sendo também uma

efetiva inibidora da peroxidação de lipídios (Di Mascio et al., 1990; Zhang et al., 1991; Silva et al., 2001).

Existem trabalhos relacionando a atuação da bixina sobre a hipercolesterolemia e estresse oxidativo, e estudos toxicológicos recentes têm demonstrado que ela não apresenta efeitos tóxicos significativos em ratos e camundongos. Todos estes fatores, aliado às propriedades e peculiaridades da bixina, a tornam um atrativo alvo pesquisa, sendo o foco do nosso estudo.

# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

# CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 - Alimentos funcionais

Os alimentos exercem uma grande influência na condição do homem e há uma clara relação entre os alimentos que consumimos e a nossa saúde. Além de ser uma fonte de calorias e nutrientes para prevenir doenças como desnutrição e raquitismo, os alimentos podem contribuir de alguma maneira para a manutenção da saúde e para a prevenção de uma ampla gama de doenças (Sanders, 1998).

Segundo o *World Câncer Research Fund,* a dieta é responsável por 30% a 40% dos cânceres e sabe-se que muitas doenças crônicas estão ligadas ao tipo de alimentação, entre as quais se incluem: aterosclerose, câncer, diabetes tipo II, hipertensão, obesidade e outras (Vieira, 2003; Sanders, 1998).

A preocupação com a nutrição preventiva tornou-se lógica uma vez que a incidência das doenças não transmissíveis aumentou, sendo o estilo de vida – incluída a dieta – um fator importante para a sua etiologia (Vieira 2003).

Apesar de a sociedade moderna ter se tornado cada vez mais complexa, modificando os padrões de vida, a baixa incidência de doenças em alguns povos chama a atenção para a sua dieta. Os esquimós, com sua alimentação baseada em peixes e produtos do mar ricos em ácidos graxos poliinsaturados das famílias ômega 3 e 6, têm tem baixo índice de problemas cardíacos, assim como os franceses devido ao consumo de vinho tinto, o qual apresenta grande quantidade de compostos fenólicos. Os orientais devido ao consumo de soja, que contém fitoestrogênios, apresentam baixa incidência de câncer de mama e nestes países, o costume de consumir frutas e verduras também resulta numa redução do risco de doenças coronarianas e de câncer, comprovados por dados epidemiológicos (Moraes e Colla, 2006).

Na década de 80 os japoneses começaram a perceber a importância da manutenção e melhoramento da sua saúde com um aumento gradual na ocorrência de doenças relacionadas com o estilo de vida e o governo se interesou no envelhecimento da população (Ohama et al., 2006). Então crescia o interesse em alimentos que, além de satisfazer requerimentos nutricionais e sensoriais básicos, desempenhassem efeitos fisiológicos benéficos (Cândido and Campos, 2005) . Desta forma, muitos estudos

foram feitos acerca dos efeitos fisiológicos de vários alimentos e seus constituintes (Ohama et al., 2006) e em 1991, um regulamento específico sobre os "Alimentos para uso específico de saúde" (FOSHU em inglês, *Foods for Specified Health*) foi introduzido pelo governo japonês (Verschuren, 2002). Talvez nenhum outro país tenha um enfoque sobre alimentos funcionais tão progressivo como o Japão, sendo que neste país, os alimentos possuem status legais confirmados e benefícios específicos identificados (Sanders, 1998).

Apesar de o conceito de alimentos funcionais ser atribuído aos japoneses, a história desse tipo de alimento é bem mais antiga. Na Ásia, muitos tipos de alimentos são tradicionalmente associados com benefícios de saúde específicos (Weststrate et al., 2002). Os alimentos funcionais nesse continente são considerados como uma parte integrante da cultura de muitos anos e há uma forte convicção de que os alimentos e os medicamentos provêm de uma mesma fonte e devem servir para um mesmo propósito. Entretanto, só recentemente os cientistas e os reguladores começaram a concordar que a "funcionalidade" dos alimentos funcionais deve ser encontrada no alimento como um todo, ao invés de seus componentes individuais (Verschuren, 2002).

Na Europa, em contraste com a Ásia, o conceito de alimentos funcionais é relativamente novo e foi adotado após um consenso europeu publicado em 1999, que definia alimentos funcionais como "alimentos que tenham demonstrado satisfatoriamente afetar uma ou mais funções no corpo, além de possuírem efeitos nutricionais adequados de modo que seja relevante tanto para melhorar o estado de saúde e bem estar quanto para reduzir o risco de doenças" (Verschuren, 2002) .

Na América Latina, embora não haja uma definição específica para alimentos funcionais, este conceito está freqüentemente em discussão em muitos países (Verschuren, 2007) e no Brasil, o Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamentou os alimentos funcionais através das resoluções: ANVISA/MS 16/99, ANVISA/MS 17/99, ANVISA/MS 18/99 e ANVISA/MS 19/99 (Moraes e Colla, 2006).

Esta área de alimentos funcionais tem se desenvolvido rapidamente e muitos novos termos têm emergido em resposta (Sanders, 1998). As definições para alimentos funcionais são várias: "Alimentos similares em aparência aos alimentos convencionais, que são consumidos como parte da dieta habitual e demonstraram benefícios

fisiológicos e/ou reduziram o risco de doenças crônicas além das funções nutricionais básicas" (Health Canada, 1997); "Alimentos, bebidas e produtos derivados de substâncias naturalmente presentes, consumidos como parte da dieta diária e que possuam benefícios particulares fisiológicos quando ingeridos" (Hilliam, 2000); "Alimentos derivados de substâncias naturalmente presentes, que podem e devem ser consumidos como parte da dieta diária". (Smith et al., 2008); "Alimentos ou bebidas que consumidos na alimentação cotidiana, podem trazer benefícios fisiológicos específicos, graças à presença de ingredientes fisiologicamente saudáveis" (Cândido e Campos, 2005).

Conhecem-se inúmeras substâncias biologicamente ativas encontradas nos alimentos funcionais, entre elas estão: fibras solúveis e insolúveis, fitoesteróis, fitoestrógenos, ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e poliinsaturados (PUFAs), derivados fenólicos, vitaminas e outros fitoquímicos (Rodríguez et al., 2003).

Para fins de instrução acadêmica, triagem clínica, desenvolvimento de alimentos funcionais e recomendações dietéticas, essas substâncias bioativas podem ser organizadas de diversas maneiras, dependendo do interesse específico. Uma delas é quanto a sua natureza química e molecular que permite categorizá-las de acordo com seu grupo molecular, como mostra o quadro abaixo.

Quadro 1: Organização de substâncias bioativas em alimentos funcionais quanto à natureza química e molecular (Adaptado de Pimentel et al, 2005).

| **Isoprenóides** | **Compostos fenólicos** | **Proteínas, Aminoácidos e afins** | **Carboidratos e Derivados** | **Ácidos Graxos e lipídeos** | **Minerais** | **Microbiótico** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Carotenóides | Cumarinas | Aminoácidos | Ácido ascórbico | PUFA Ômega-3 | Ca | Probiótico |
| Saponinas | Taninos | Compostos Alil-S | Oligossacarídeos | MUFA | Se | Prebiótico |
| Tocotrienos | Lignina | Isotiocianatos | Polissacarídeos não amiláceos | Esfingolipídeos | K | |
| Tocoferóis | Antocianinas | Folato | | Lecitina | Cu | |
| Terpenos simples | Isoflavonas | Colina | | | Zn | |
| | Flavonóides | | | | | |

Além de diversos conceitos, os alimentos funcionais são conhecidos internacionalmente por diversos nomes diferentes (Cândido e Campos, 2005), sendo que nos Estados Unidos os mais utilizados são: *Medical food* (61%), *Nutraceutical* (59%), *Functional food* (55%), *Nutritional food* (52%), *Pharmafood* (41%), *Designer food* (39%), *Fitness food* (39%), *Therapeutical food* (34%), entre outros (Park et al., 1997).

Apesar dos cientistas e os reguladores estarem ganhando mais experiência e entendimento sobre saúde e nutrição, a complexidade sobre o tema alimentos funcionais continua a crescer. Embora os consumidores associem os alimentos com a cura de doenças, há uma clara distinção entre os papéis dos alimentos e das drogas. Estudos epidemiológicos e clínicos são necessários para correlacionar alimentos regionais, dietas e doenças, também sendo necessário um melhor entendimento das bases genéticas das populações e quais influências isto pode exercer sobre os estados de saúde e doença (Verschuren, 2002) .

Reconhecer o papel do consumo de alimentos no crescimento, desenvolvimento e risco de doenças é importante para o entendimento de como as dietas influenciam estas áreas. Há uma gama de possíveis interações entre os componentes dietéticos específicos e as vias genéticas específicas envolvidas na saúde. Entender essas interações pode fornecer informações para o estabelecimento de recomendações dietéticas e benéficas para a população (Verschuren, 2002).

A medicina tradicional ou “alternativa” fornece várias formas de tratamentos ditos homeopáticos para inúmeras patologias que acometem os seres humanos. Uma das formas terapêuticas preconizadas por esta corrente tradicional da medicina é o consumo de infusões de diferentes plantas medicinais. Sabe-se que o consumo da infusão de alcachofra e alecrim é capaz de reduzir os níveis plasmáticos de colesterol (Cortella e Pochettino, 1997) e o chá de urucum têm sido descrito pela comunidade médica local como tendo efeito hipocolesterolêmico em indivíduos com taxa de colesterol acima do normal. Sendo assim, caso esta propriedade se confirme, o urucum, um alimento comum do nosso cotidiano, pode estar também relacionado aos demais alimentos que possuem alegações funcionais na hipercolesterolemia.

## 2.2 – Urucum

### 2.2.1 - Etnobotânica e Taxonomia

A planta do urucuzeiro, devido à sua dispersão em diferentes regiões do mundo, encontra-se com vasta sinonímia vulgar, sendo conhecida como annato, achiote ou urucum (em inglês, espanhol e português respectivamente), entre outras (Giuliano et al., 2003; Franco et al., 2006).

O urucuzeiro pertence à família *Bixaceae* e ao gênero *Bixa*, quanto à espécie, apesar de existirem várias, a mais freqüente em nosso meio é a *Bixa Orellana* (Franco et al., 2006), cujo nome foi dado em homenagem a Francisco Orellana, primeiro cientista europeu a navegar e explorar o Rio Amazonas em 1541 (Giuliano et al., 2003; Preston e Richard, 1980; Franco et al., 2006).

O Sistema de Engler classifica o urucuzeiro em:

Quadro 2: Classificação etnobotânica do urucuzeiro segundo Lima (1990):

| | |
|---|---|
| XVIII Divisão: | *Angiospermae* |
| Subdivisão: | *Angiosperma* |
| Classe: | *Dicotiledoneae* |
| Ordem: | *Parietales* |
| Subordem: | *Cistianeae* |
| Família: | *Bixaceae* |
| Gênero: | *Bixa* |
| Espécies: | *Bixa orellana L. (tipo cultivado), Bixa arbórea, Bixa Americana, Bixa urucurana, Bixa purpúrea, Bixa upatensis, Bixa tinetoria, Bixa oviedi.* |

O urucuzeiro é uma planta nativa da Floresta Tropical da América Central e do Sul (Felicissimo et al, 2004) é um arbusto que pode alcançar de 2 a 9 m de altura sendo uma planta ornamental, pela beleza e colorido de suas flores e frutos (Barbosa-Filho, 2006). As flores possuem cor rosa claro e apresentam ovário contendo uma série de óvulos em seu interior. Elas são hermafroditas com cinco sépalas, surgindo nas extremidades dos ramos, formando fascículos onde nascem cápsulas ovóides com dois

carpelos cobertos de espinhos flexíveis, com cinco pétalas orbiculares, glandulosas na base, decíduas, ovais, inteiras. Os estames são numerosos e as anteras ovais, pistilo simples e alongado. Cada inflorescência é composta por um número variável de flores (10 a 80). As folhas são alternadas, completas, com longos pecíolos, cordiformes, acuminadas, dispostas alternadamente em relação aos ramos, glabras (quando adultas), medindo de 8 a 20 cm de comprimento e 4 a 15 cm de largura. O seu sistema radicular é pivotante, apresentando um eixo principal de onde saem raízes secundárias e terciárias. Os frutos possuem o formato do tipo cápsula ou cachopa, ovóide ou globosa, com 2 a 3 carpelos que variam de 3 a 4 cm de comprimento e 3 a 4,5 cm de diâmetro, nos quais se encontram sementes de 5 a 6 mm de comprimento. Externamente, são revestidos por espinhos inofensivos e possuem coloração variável entre o verde, vermelho-pálido e roxo. No seu interior, são encontradas, em média, 40 sementes. As sementes são grosseiramente arredondadas, revestidas por uma polpa mole de coloração avermelhada, as quais se tornam secas, duras e de coloração escura com o amadurecimento. Apresentam comprimento e diâmetro médios de 0,55 e 0,4 cm, respectivamente (Franco et al., 2006). É uma planta de polinização cruzada e por isso altamente heterozigota (Rivera-Madrid et al., 2006).

Figura 1 - Fotos de urucum. A: Urucuzeiro, B: Floração e frutificação, C: Folhas (posições dorsal e ventral), D: Raiz, E: Fruto, F: Fruto aberto com sementes expostas. Fonte: Barbosa-Filho, J.M. (2006).

### 2.2.2 – Uso do urucum como corante

O pigmento do urucum é conhecido há muito tempo, tendo sido utilizado pelos índios sul-americanos no artesanato, na coloração de seus corpos e de seus instrumentos de caça e de pesca, como repelente de insetos, como corante de alimentos, e como batons pelas mulheres (Preton e Richard, 1980; Souza, 2001; Giuliano et al., 2003). Atualmente observa-se aplicação desse pigmento como corante ou condimento doméstico e até sua aplicação industrial em alimentos, fármacos e cosméticos. (Preston e Richard, 1980; Bouvier et al., 2003; Giuliano et al, 2003; Felicissimo et al., 2004).

Existe um interesse considerável no mundo todo no desenvolvimento de corantes de fontes naturais para serem usados no processamento de alimentos, para torná-los mais visualmente atraentes. Entre os corantes naturais, extratos obtidos do urucum têm sido amplamente usados em muitos alimentos industrializados, especialmente produtos lácteos (Jorge et al., 1998).

Do urucum são fabricados os corantes naturais mais difundidos na indústria de alimentos, ou seja, os produtos de urucum representam aproximadamente 70% (em quantidade) de todos os corantes naturais e 50% de todos os ingredientes naturais que têm função corante nos alimentos (Ghiraldini, 1994). De suas sementes podem se obter corantes com grande variação de tons, que vão desde o amarelo-laranja ao vermelho (Nielsen, 1990; Ghiraldini, 1994).

Na indústria de alimentos são utilizadas para dar cor em manteiga, margarina, maionese, molhos, mostarda, salsichas, sopa, sucos, sorvetes, produtos de panificação, macarrão e queijo, sendo também é bastante empregado na indústria da impressão e na tintura (Franco et al., 2006).

Embora o uso do urucum não tenha restrições nos EUA, há algumas restrições de uso na Europa aonde, atualmente, a ingestão diária aceitável (IDA) 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 IDA. 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).

### 2.2.3 – Produção de grãos e produtos derivados do urucum

Hoje, o urucum é cultivado em muitos países tropicais como: Bolívia, Brasil, Sri Lanka, República Dominicana, Equador, Guiana, índia, Jamaica, México, Peru e Suriname e em menor escala na África, como por exemplo, na Angola, Quênia, Nigéria, Tanzânia e no Pacífico como as Filipinas e o Hawaii (Preston e Richard, 1980). Estimativas de 2006 mostravam que o Peru é o maior produtor mundial de urucum, seguido do Brasil e do Quênia (Balaswamy et al., 2006).

No Brasil, 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). Existem 35 indústrias produtoras de corantes no território brasileiro, desse total 54,17% são produtoras de corantes naturais e 12,5% produzem corantes artificiais. Dentre os corantes naturais, o urucum é o mais produzido e utilizado. Em 1999 a produção brasileira de grãos de urucum situava-se, em torno de 10.000 a 12.000 t/ano, sendo que desse total, 60% eram destinados à fabricação de colorau/colorífico, 30% à fabricação de corantes e 10% à exportação. As principais aplicações dos corantes à base de urucum nas indústrias alimentícias são: no setor de embutidos (salsichas) onde o consumo é cerca de 1,5 milhões de litros/ano do corante líquido hidrossolúvel (norbixina); nas indústrias de massas, onde o consumo é de cerca de 500 mil litros do corante lipossolúvel/ano (bixina); nas indústrias de queijos (tipo prato) de 200 mil litros do corante líquido hidrossolúvel/ano; nas indústrias de sorvetes e confeitarias, cerca de 120 mil litros do corante hidrossolúvel e estima-se que mais de 2,8 t/ano de bixina e norbixina sejam consumidas em outros alimentos e em outras aplicações não alimentícias (cosméticos e farmacêuticos). (Franco et al., 2006).

Em 2000, foi estimado em 1.200 t o consumo de colorífico no Brasil. Para o segmento de condimentos, especiarias e temperos, o colorífico representa 44,6%, seguido da pimenta-do-reino com 35,4%, a canela 4,1%, o cominho 4,0% e 11,9% para a pimenta com cominho, bicarbonato, orégano, louro, erva doce, cravo, camomila e outros.

O consumo de colorífico é mais popular na região Nordeste do Brasil ou em áreas de maior concentração da população nordestina, pela tradição no consumo deste

corante natural na sua culinária. Assim, em 2001 estimava-se em 1.600 t de colorífico consumido anualmente (Franco et al., 2006).

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 (May, 1997; Cuen et. al., 2003).

Há uma tendência de crescimento do mercado de corantes naturais, sendo o urucum o principal, tanto no mercado interno como externo, sendo importante ressaltar que o custo de produção pode ser totalmente diferente a depender da região, uma vez que ocorre variação nos custos de insumos e mão-de-obra (Franco et al., 2006).

### 2.2.4 – Composição e propriedades do urucum

Bressani et. al., (1983) conduziram estudos de análise de sementes de urucum, com enfoque especial para seu valor nutricional. Os resultados revelaram elevados teores de fibras totais (16%); altos teores de fósforo e baixos teores de cálcio e elevadas quantidades de proteína, (13 a 17 %). O valor nutricional de proteína corresponde cerca de 65 % daquele encontrado na caseína, usada como referência. Em quantidades majoritárias estavam presentes os aminoácidos lisina e triptofano e, em menores quantidades metionina, isoleucina, leucina fenilalanina e treonina. A análise da semente apresentou 17,5% de lipídeos entre eles o ácido linoléico, α-linoléico e o oléico.

Os autores relatam que a deficiência de aminoácidos, particularmente metionina faz desta farinha um produto de baixo valor biológico. Também foi constatada a baixa digestibilidade da proteína: 57% comparada a 94 % para a caseína. Os autores sugerem

ainda que mais de 50% das fibras podem ser eliminadas por peneiramento da farinha trazendo conseqüentemente um aumento da digestibilidade.

O urucum é anestésico, é útil nas dores de cabeça, desordens sanguíneas, pode ser utilizado como antiemético e para aliviar a sede. As sementes são adstringentes, febrífugas e um bom remédio para a gonorréia. A casca da raiz é útil também na gonorréia para febres intermitentes e funciona como antipirético. A infusão das folhas e raízes é útil na epilepsia, desinteira febre e icterícia (Shilpi et al., 2006).

Prévios estudos farmacológicos têm revelado que extrato de *Bixa Orellana* possui atividades antiprotozoários, anti-helmínticas e antienvelhecimento. Extrato de folhas e galhos tem mostrado ser efetivo em neutralizar os efeitos de venenos de cobras. Extratos de diferentes partes (folhas e sementes em particular) têm mostrado atividade antimicrobiana *in vitro*. O extrato das sementes tem sido relatado em exibir atividade quimiopreventiva e antioxidante (Shilpi et al., 2006).

Fleischer et al., (2003) estudaram extratos etanólicos de folhas e sementes de urucum e estes demonstraram atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram - negativas (*Bacilus subtilis, Staphilococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Salmonela typhi, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli)* além de serem efetivos também sobre o fungo *Candida albicans*.

Shilpi et al., (2006) utilizaram de um extrato metanólico de folhas de *Bixa orellana* para investigar as suas atividades neurofarmacológicas, anticonvulsivas, analgésicas e antidiarréicas, bem como a motilidade gastrointestinal e observou-se que estes estudos preliminares providenciam em parte um suporte científico para o uso desta espécie na medicina tradicional, particularmente em alvos relacionados às desordens do sistema nervoso central, dores, diarréia e disenteria.

Foram testadas as propriedades antifúngicas e anti-leishimaniose de 24 extratos metanólicos em um estudo realizado por Braga et al (2007), e entre os extratos testados, o extrato de frutos de *Bixa orellana* se revelou como o mais ativo contra *C. neoformans*, causador de meningite criptococcica. O extrato foi considerado como um forte inibidor, atingindo valores de MIC (concentração mínima inibitória) de 0, 078 mg/mL, numa escala classificatória que segundo Aligiannis et al., (2001) define que são inibidores fortes aquelas substâncias com MIC  até 0,5 mg/ml, são inibidores moderados aquelas com MIC  0,6 e 1,5 mg/ml e inibidores fracos aquelas com MIC acima de 1,6 mg/ml.

### 2.2.5 - Principais substâncias do urucum

Desde a recente proibição do uso da tintura sintética Tartrazine (FD & C-Yellow 5) em muitos países há um aumento internacional do interesse sobre os pigmentos do urucum devido à sua falta de toxicidade. Entre os métodos aplicados para obtenção de pigmentos do urucum, há a extração das sementes com soluções aquosas de hidróxido de sódio, hidróxido de potássio ou outros solventes apropriados tais como propilenoglicol, óleos ou água pura, além de métodos alternativos como o atrito mecânico das sementes para desgastar a camada de pigmentos, que é geralmente feito em moinhos (Shuhama et al., 2003).

O urucum, um pigmento amarelo-vermelho, é uma mistura de muitos carotenóides, tais como bixina, norbixina, fitoenos e δ-carotenos (Mercadante et al., 1996), sendo a bixina e a norbixina os dois principais produtos processados do urucum, representando 90% do total de pigmentos encontrados em suas sementes (Preston e Richard, 1980).

Dos carotenóides presentes nas sementes do urucum, 80% consistem do apocarotenóide bixina, o qual tem sido encontrado até o momento somente em *Bixa orellana* (Mercadante et al., 1996).

A bixina ($C_{25}H_{30}O_4$) é um carotenóide que não possui atividade pró-vitamina A, contendo dois grupos carboxílicos, sendo que um é um éster monometílico (De Oliveira et al., 2003). Embora menor que os carotenóides usuais, a bixina é também formada por uma cadeia de duplas ligações conjugadas alternadas, os quais permitem algumas características especiais. Este pigmento ocorre na forma não estável cis (metil-hidrogênio 9'-*cis*-6,6'diapocaroteno 6,6'dioato) na fruta da planta, tornando-se logo na forma estável trans sobre a extração por organosolventes e/ou calor (Lying et al, 2005).

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

O cromóforo da bixina é o sistema conjugado de ligações duplas que lhe confere a cor, entretanto estas ligações duplas conjugadas também são a fonte da susceptibilidade da bixina a alterações pelo oxigênio sendo a maior causa da sua perda de cor, assim como em outros carotenóides (Collins, 1992).

A norbixina, forma desmetilada da bixina, ($C_{24}H_{27}O_4$), tem forte poder de coloração, é um apocarotenóide hidrossolúvel, extraído via saponificação da polpa da semente e posterior acidificação para precipitar um pó contendo 30-40% de norbixina (Giuliano et al., 2003).

A conversão de bixina em norbixina é feita pela diluição da bixina em meio alcalino, a bixina perde um grupo metil produzindo a norbixina, pigmento de cor vermelho intenso que após a separação e secagem é comercializada na forma de pó ou pasta (Carvalho e Hein, 1989).

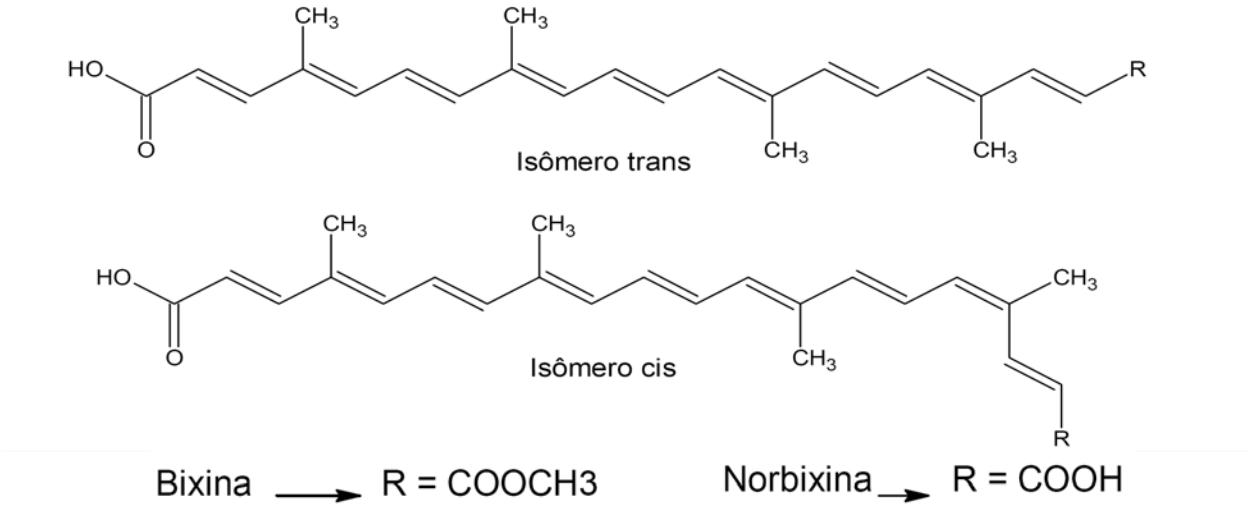


Figura 2: Estruturas moleculares da *cis* e *trans* bixina e *cis* e *trans* norbixina.

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; absorbância 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 198º C, coloração amarela em extrato diluído e vermelha escura em extrato concentrado, instável a luz e a temperaturas acima de 125º C.

**Propriedades da norbixina:** hidrossolúvel, insolúvel em álcool, propileno glicol, óleo e gordura, absorbância máxima a 527 nm, 491 nm, e 458 nm em dissuleto de carbono e ponto de fusão de 300º C. a norbixina é instável na presença de luz e em solução quando se muda o pH.

Bixina e norbixina são suscetíveis à degradação oxidativa e a perda de cor ocorre depois de prolongada exposição à luz e/ou a elevadas temperaturas (Lying et al, 2005).

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 estabelecer várias faixas operacionais para o processamento destes pigmentos.

O extrato de urucum, em meio anidro, apresenta uma estabilidade considerável à oxidação pelo ar, porém sob os efeitos da luz apresenta uma resistência mais baixa, sendo que estes efeitos são proporcionais as suas intensidades. A persistência da cor sob forte iluminação pode ser aumentada pela adição de palmitato de ascorbil, já a presença de radicais livres, ou qualquer promotor dessas espécies em extratos de urucum, pode levar a uma perda rápida de cor devendo então ser evitada (Najar et al., 1988).

Como a demanda de urucum e outros corantes naturais aumentaram, (Ghiraldini, 1994), especificações mais rigorosas são impostas e melhores entendimentos de sua química e bioquímica são garantidos.

Prévias investigações fitoquímicas têm revelado a presença de muitos carotenóides derivados, alguns terpenóides, tocotrienóis, arenos e flavonóides (incluindo luteonina e apigenina) nas sementes do urucum. Investigações sobre suas folhas têm revelado a presença de flavonóides bisulfatos e nas raízes foi encontrado o triterpeno ácido tomentósico (Shilpi et al., 2006).

Harborne (1975) relatou o isolamento dos flavonóides 7-glicosilapigenina, 7-bissulfato-apigenina, 7-glicosil luteolina, 7-bissulfato luteolina em sementes de urucum.

Mercadante et al., (1997) em estudos prévios sobre apocarotenóides menores presentes na semente do urucum, relataram em um primeiro momento a ocorrência de quatro apocarotenóides (C30 e C32), cinco diapocarotenóides (C19, C22, C24, C25) e

um carotenóide (C14). Adicionalmente dois apocarotenóides que não tinham sido previamente detectados no urucum foram isolados.

Mercadante et al., (1999) isolaram três outros apocarotenóides do urucum: 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'-diapocarotem-6-6'-dioato, tendo sido esta a primeira vez que foi encontrado o geranilgeraniol esterificado com um ácido carboxílico carotenóico.

### 2.2.5.1 – Bixina e propriedades funcionais: propriedades toxicológicas, hipocolesterolêmicas e sobre o estresse oxidativo

#### 2.2.5.1.1 - Propriedades toxicológicas

Durante décadas, centenas de efeitos anticarcinogênicos e protetores do DNA têm sido detectados em alimentos derivados de plantas (Agner et al; 2004). Embora a bixina seja um dos mais efetivos quelantes de oxigênio molecular simpleto biológico, e que a atividade protetora de alguns carotenóides contra danos quimicamente induzidos no DNA tem sido demonstrada, dados toxicológicos sobre corantes obtidos do urucum são escassos na literatura e as informações genotóxicas sobre o extrato são limitadas a poucos estudos *in vivo.* (Antunes et al., 2005).

Nenhum efeito tóxico foi observado em ratos que receberam doses subagudas de bixina nas concentrações de 2000 mg/Kg/dia (4 semanas -20 doses )(Bautista et al., 2004). Entretanto, estudos de toxicidade subcrônica oral mostraram alterações em parâmetros bioquímicos como fosfatase alcalina, fosfolípides, proteínas totais, albumina e taxa de albumina/globulina, bem como marcada elevação do peso do fígado e hipertrofia hepatocítica de uma maneira dose dependente em ratos Sprague-Dawley submetidos a tratamento com extrato de urucum (91,6% de norbixina) nas concentrações de 0, 0.1, 0.3 e 0.9% tratados durantes treze semanas (Hagiwara et al., 2003).

Agner et al., (2004) induziram danos ao DNA por tratamento com N – dietilnitrosamina (DEN) e após tratamento com bixina (concentrações 0,07; 0,80 e 4,23mg/Kg de peso corporal/dia) observou-se que o extrato não mostrou efeitos

hepatocarcinogênicos, mas também não mostrou efeitos potenciais de modificação contra danos induzidos por DEN.

Alves de Lima et al., (2003) demonstraram que três concentrações de urucum, com 30% de bixina, (1330, 5330 e 10,670 ppm) incorporadas na dieta de camundongos machos Swiss, não apresentaram atividades mutagênicas sobre células da medula desses animais, mas também não foram eficientes em inibir mutações induzidas.

Paumgartten et al., (2002) tratou fêmeas Wistar do sexto ao décimo quinto dia de gestação com doses de concentrações 0, 31.2, 62.5, 125, 250 e 500 mg/Kg de peso corporal/dia de urucum com 28% de bixina, a fim de avaliar se algum efeito adverso ocorreria nas fêmeas e suas proles e observaram que nenhum efeito adverso foi observado nas fêmeas testadas e não houve indução de qualquer aumento na incidência de anormalidades esqueléticas ou viscerais externamente visíveis nas proles expostas, e que o urucum não foi maternalmente tóxico nem embriotóxico nos ratos.

#### 2.2.5.1.2 - Propriedades hipocolesterolêmicas

Estudos epidemiológicos têm indicado que o consumo de frutas e vegetais ricos em carotenóides está associado com uma menor incidência de câncer e doenças cardiovasculares (Reddy et al., 2005). Alguns estudos correlacionando o uso da bixina na redução do colesterol total tem sido feitos em diferentes modelos animais.

Luduving (1997) , com a finalidade de investigar a recomendação popular do uso de urucum em problemas cardiovasculares, relata que após testes com cães, ratos e coelhos, a eficiência da água do urucum, obtida por maceração das sementes, foi comprovada na redução significativa dos índices de colesterol.

Lima et al., (2001) avaliaram a ação terapêutica da quercetina, bixina e norbixina, na dose de 0,01mol/Kg em coelhos hiperlipidêmicos induzidos por dieta contendo colesterol 1% + ácido cólico 0,1%, durante 28 dias. Após este período experimental e realização de dosagens sorológicas, observou-se que os teores de colesterol foram menores para os animais tratados somente com bixina (redução de 44%) e que o tratamento associado de bixina + quercetina provocou uma maior porcentagem de redução dos triacilgliceróis.

Em outro estudo, Lima et al., (2003) conduziram um experimento semelhante, onde houve alteração apenas na concentração do colesterol da dieta (substituição de 1% para 0,5%). Neste novo experimento, os autores observaram resultados semelhantes, onde a bixina foi a mais efetiva na redução dos níveis séricos de colesterol, além de ser responsável por um aumento nos níveis de colesterol HDL e por uma redução dos níveis de triacilgliceróis.

Rodrigues et al., (2003) avaliaram 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, Na dieta com leite de vaca e o tratamento com bixina houve uma redução do colesterol total (24,52% no 16° dia, e, de 22,53% no 31° dia). Em relação aos triacilgliceróis houve uma redução no grupo que recebeu o tratamento com bixina e com naringenina + bixina, embora sem significância estatística. Na dieta com leite de cabra não houve diferenças significativas entre os grupos quanto ao parâmetro colesterol total, mas em relação à fração HDL 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 estatisticamente diferente dos outros grupos.

Carvalho et al., (2004) compararam os efeitos do flavonóide naringenina e da bixina associados ao leite de cabra em coelhos, e observaram que a mistura com bixina reduziu as concentrações de colesterol total (17,03% após 16 dias e 8,14% após 31 dias), sendo que o melhor resultado para HDL (aumento de 56,8% em 16 dias e 40,4% com 31 dias) também estava associado ao tratamento com bixina.

#### 2.2.5.1.3 - Propriedades sobre o estresse oxidativo

O estresse oxidativo tem sido definido como um distúrbio no estado de equilíbrio, no sistema de pró-oxidantes e antioxidantes, nas células intactas. 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 glutationa e a vitamina E, tendo como resultado final, o dano oxidativo em lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos. (Jordão Jr et al., 1998).

As lesões causadas pelos radicais livres nas células podem ser prevenidas ou reduzidas por meio da atividade de antioxidantes, sendo estes encontrados em muitos alimentos. Os antioxidantes naturais podem proteger o corpo humano dos radicais livres e retardar a oxidação de lipídios e o progresso de muitas doenças crônicas (Kinsela et al., 1993; Lai et al., 2001). Eles podem agir diretamente na neutralização da ação desses radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função (Shami e Moreira, 2004).

Uma vez que há evidências que altos níveis de antioxidantes são associados com menores freqüências de doenças coronárias (Hussein et al., 2001), e que menores níveis de antioxidantes no plasma podem favorecer a formação de radicais livres e promover a peroxidação do LDL (Dabbagh et al., 1994; Stocker e Keaney, Jr., 2004) a associação de drogas redutoras de colesterol plasmático e substâncias antioxidantes parece ser uma proposta lógica para a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia e prevenção da aterosclerose (Jorge,1997).

Dentre os antioxidantes estão a vitamina C, a glutationa, o ácido úrico, a vitamina E e os carotenóides (Shami e Moreira, 2004).

Entre os carotenóides naturais, bixina é um dos mais efetivos supressores biológicos de moléculas de oxigênio simpleto e pode contribuir para a proteção das células e tecidos contra os efeitos deletérios dos radicais livres, sendo também um efetivo inibidor da peroxidação de lipídios (Di Mascio et al., 1990; Zhang et al., 1991; Silva et al., 2001).

Zhang et al., (1991), avaliaram o efeito de inibição da peroxidação de alguns carotenóides como o beta-caroteno, a castaxantina, a luteína, o alfa-tocoferol, o licopeno e a bixina, e constataram que eles foram eficazes em inibir os efeitos conseqüentes das transformações neoplásticas induzidas quimicamente. Dos carotenóides testados, o alfa tocoferol, seguido pela bixina foram os inibidores da peroxidação lipídica mais ativos.

Silva et al., (2001) avaliaram a ação antioxidante da bixina (2.5 ou 5.0 mg/kg de peso corporal) sobre aberrações cromossômicas e peroxidação lipídica induzidas por cisplatina em ratos, e observaram reduções no número total de aberrações, inibição do aumento da peroxidação lipídica e inibição da depleção de glutationa renal.

Segundo Lima et al., (2003) bixina e norbixina têm importância na prevenção de aterosclerose devido ao seu efeito antioxidante. Uma vez que as lesões ateroscleróticas

iniciam-se após algum tipo de lesão no endotélio, que geralmente são causadas pela oxidação da LDL, a inibição da oxidação resulta conseqüentemente na proteção do endotélio.

## 2.3 - Metabolismo das lipoproteínas

Clinicamente, o colesterol e triacilgliceróis são os lipídios plasmáticos mais importantes. O colesterol é componente das membranas celulares, precursor de hormônios estróides, vitamina D, de oxisteróis e ácidos biliares, sendo também requerido para a ativação de moléculas sinalizadoras neuronais. Somente uma pequena quantia de colesterol circulante origina da dieta; aproximadamente 80% é derivado da síntese endógena, na qual a 3-hidrosi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) catalisa a etapa limitante da reação de síntese do colesterol. A maioria do colesterol na circulação está sob a forma esterificada, com o colesterol livre constituindo a menor fração. Os triacilgliceróis, uma fonte chave de energia, são compostos por ácidos graxos livres ligados por grupos éster a uma molécula de glicerol. Eles são sintetizados nas células do intestino e do fígado e transportados através do plasma e, após lipólise na superfície endotelial, libera ácidos graxos livres para células periféricas para β-oxidação ou estocagem (Hegele, 2009).

A insolubilidade do colesterol e dos triacilgliceróis no plasma requer que eles sejam transportados em macromoléculas esferoidais chamadas lipoproteínas (Hegele, 2009).

As lipoproteínas plasmáticas são complexos moleculares de lipídios e proteínas específicas denominadas apolipoproteínas. Estas partículas dinâmicas estão em constante estado de síntese, degradação e remoção do plasma. Quatro classes maiores de lipoproteínas (quilomícrons – QM, lipoproteínas de densidade muito baixa – VLDL, lipoproteínas de densidade baixa – LDL e lipoproteínas de alta densidade – HDL) e duas lipoproteínas quantitativamente menores [IDL – lipoproteína de densidade intermediária e Lp(a) – Lipoproteína(a)] podem ser identificadas baseadas no tamanho da partícula, composição química, características físico-químicas e mobilidade eletroforética (Bachorik et al., 2000; Champe & Harvey, 2000).

O tamanho e a diversidade das lipoproteínas variam de acordo com a proporção de seus constituintes lipídicos e protéicos. 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 fosfolipídios e somente traços de triacilgliceróis (Bachorik et al., 2000).

Tabela 1: 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- triglicérides; FL- fosfolípides; PR-proteínas.**

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

As principais lipoproteínas transportadoras de triacilgliceróis são os quilomícrons e a VLDL, enquanto as principais lipoproteínas carreadoras de colesterol são a LDL e a HDL (Hegele, 2009).

O metabolismo de lipídios da dieta envolve um grande número de etapas. Os lipídios mais complexos são degradados em suas moléculas constitutivas no lúmen do intestino. Estas são absorvidas pelo enterócito onde sofrem ressíntese dentro de um complexo lipídico e são ultimamente reunidos dentro dos quilomícrons (Cooper, 1997).

Os quilomícrons são secretados na linfa, e uma vez na circulação, sofrem hidrólise de seus triacilgliceróis pela lipoproteína lipase (LPL), a principal enzima

responsável pela hidrólise de triacilgliceróis presente em lipoproteínas, formando os quilomícrons remanescentes (Cooper, 1997; Goldberg, 1996). Essas partículas são enriquecidas de ésteres de colesterol, vitaminas solúveis em gorduras, contêm apo-B48 e apo-E e são rapidamente removidas da circulação pelo fígado (Cooper, 1997). Dentro do fígado, os quilomícrons remanescentes são decompostos em seus aminoácidos e componentes lipídicos. O colesterol liberado dos lisossomos nos hepatócitos podem ser secretados na bile, convertidos à ácidos biliares, incorporados em VLDLs para secreção no sangue via Complexo de Colgi ou esterificado como longas cadeias de ácidos graxos e estocados nos hepatócitos (Olson,1998).

VLDL, a principal lipoproteína do fígado, contém colesterol, fosfolípides, triacilgliceróis, apo-B100 e pequenas quantidades de apo-E e apo-C. Parte dos triacilgliceróis da VLDL são hidrolisados pela LPL para formar IDL, que pode ser considerada como VLDL remanescente, que é então captada pelo fígado (Olson, 1998). Parte da fração IDL é degradada pela lipase hepática à LDL, uma lipoproteína que carreia aproximadamente dois terços do colesterol plasmático humano e que contém somente a apo-B100 (Olson, 1998; Oram e Vaughan, 2006).

HDLs carreiam aproximadamente um terço do colesterol no plasma humano e sua principal função é o transporte de colesterol de tecidos periféricos para o fígado para eliminação na bile. Isto ocorre por uma via chamada transporte reverso do colesterol, a qual envolve a ação coordenada de múltiplas proteínas celulares e plasmáticas (Oram e Vaughan, 2006).

Um precursor de HDL, contendo apo-A1, apo-A2, apo-A3, fosfolípides e colesterol livre é sintetizado no fígado e secretado no sangue. Apo-A1, um co-fator para lecitina colesterol acil transferase (LCAT), estimula esta enzima a transferir ácidos graxos da lecitina para o colesterol para formar ésteres de colesterol, o qual permite HDL-3 assumir sua forma esférica com um centro hidrofóbico e um exterior mais polar (Olson, 1998).

Proteínas transferidoras de éster de colesterol **(**CETEP) adicionalmente aumentam o conteúdo de HDL-3 para formar HDL-2 (Olson,1998). CETEP media a entrega da maior parte do colesterol esterificado da HDL para lipoproteínas contendo apo-B (VLDL e LDL) em troca por triacilgliceróis. As partículas geradas então são enriquecidas em triacilgliceróis em relação ao seu conteúdo de ésteres de colesterol e

seguindo a hidrólise dos triacilgliceróis mediada pela lipase hepática, os ésteres de colesterol sofrem remoção pelo receptor SR-B1 (Gotto et al., 2004).

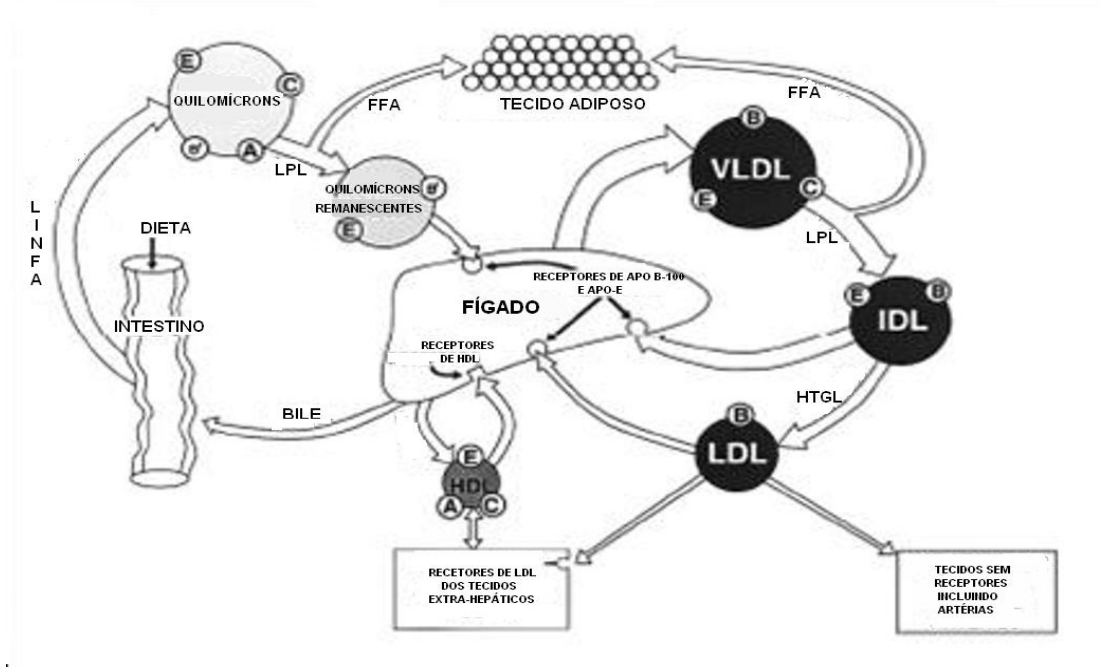


Figura 3: Metabolismo das lipoproteínas. QM – quilomícrons, VLDL - lipoproteínas de densidade muito baixa LDL - lipoproteínas de baixa densidade -, IDL - lipoproteína de densidade intermediária, LPL – lipoproteína lipase, LCAT – lecitina colesterol acil transferase, FFA – ácidos graxos livres, HTGL – lipase hepática de triacilgliceróis. Adaptado de Olson, 1998.

## 2.4 - Dislipidemias

Existe um delicado equilíbrio no organismo para cobrir as necessidades de lipídeos das células e, ao mesmo tempo, evitar seu acúmulo excessivo. Por razões não muito claras, esse equilíbrio pode romper-se, elevando o nível de um ou mais componentes lipídicos na corrente sanguínea, ao que se denomina dislipidemia (Gonçalves et al., 2006).

A apresentação laboratorial das dislipidemias compreende quatro situações bem definidas: hipercolesterolemia isolada (valores de aumentados de colesterol total); hipertrigliceridemia isolada (valores aumentados de triacilgliceróis); hiperlipidemia mista (valores aumentados do colesterol total e dos triacilgliceróis) e diminuição isolada de HDL ou em associação com aumento de LDL e/ou dos triacilgliceróis (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 1996).

A associação entre dislipidemias e aterosclerose é universalmente aceita pela comunidade científica. Os dados que permitem estabelecer com segurança esse vínculo

foram obtidos de estudos anatomopatológicos, experimentais, epidemiológicos e clínicos, a maioria deles utilizando, para análise, valores bioquímicos das dosagens de colesterol total, triacilgliceróis, HDL ou determinação indireta de LDL (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 1996).

Um conjunto substancial de evidências demonstram associações independentes de LDL e de HDL com o risco de doenças coronárias. Resultados de vários estudos epidemiológicos têm encontrado que a incidência de doenças coronárias está diretamente correlacionada com os níveis de LDL e inversamente correlacionada com os níveis de HDL. O estudo Framingham encontrou uma taxa de redução de doenças coronária de 1% para cada 1% de redução dos níveis de LDL em homens e mulheres de meia-idade observados por uma média de 12 anos. Neste estudo, uma similar e independente associação foi observada para os níveis de HDL, com os maiores níveis sendo associados aos menores riscos subseqüentes de doenças coronárias (Dean et al., 2004) .

Outro agravante são os níveis elevados de triacilgliceróis, que se não for um fator de risco isolado para aterosclerose, acabam potencializando os papéis da LDL e HDL (Austin, 1999). Estudos epidemiológicos submetidos à análise multivariada demonstraram que a hipertrigliceridemia isolada não constitui fator de risco independente de doença arterial coronária. Seu grau de risco varia na razão direta do valor do colesterol LDL e na razão inversa do colesterol HDL. Além disso, a hipertrigliceridemia favorece a trombogênese por se associar à ativação de fatores de coagulação e ao aumento da adesividade plaquetária (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 1996).

A terapêutica das dislipidemias, de comprovada eficiência, tem por finalidade fundamental a prevenção primária e secundária da doença arterial coronária e da doença arterial cerebrovascular e periférica. Deve ser iniciada com mudanças individuais no estilo de vida, que compreendem hábitos alimentares saudáveis, busca e manutenção do peso ideal, exercício físico aeróbico regular, combate ao tabagismo e promoção do equilíbrio emocional. Não sendo atingidos os objetivos propostos, devem ser considerados a introdução de drogas isoladas ou associadas, dependendo das necessidades, com manutenção da dietoterapia (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 1996).

## 2.5 – Aterosclerose

A aterosclerose consiste de uma enfermidade lenta e progressiva, que geralmente inicia-se na infância e suas manifestações clínicas revelam-se na idade adulta (Nogueira et al., 2005), afeta primariamente as artérias elásticas (aorta, artérias carótidas e ilíacas, por exemplo) e as artérias musculares de médio e grande calibre (tais como artérias coronárias e poplíteas) (Ribeiro e Shintaku, 2004). É caracterizada pelo acúmulo de depósitos de colesterol em macrófagos na íntima dessas artérias, cuja deposição leva à proliferação de certos tipos celulares dentro da parede arterial, diminuição gradual do lúmen dos vasos e impedimento do fluxo sanguíneo. Este processo pode ser completamente insidioso durante décadas até que este depósito se rompe, por forças físicas do fluxo sanguíneo, e componentes da parede arterial são expostas ao fluxo sanguíneo, levando à trombose e ao comprometimento do suprimento de oxigênio para os órgãos alvo como o coração e cérebro (Stocker e Keaney, 2004). Embora qualquer artéria possa ser afetada, a aorta e os sistemas cerebrais e coronários são os alvos principais; portanto os infartos do miocárdio e derrames cerebrais são as duas principais conseqüências dessa doença (Matos, 2002).

Atualmente está bem estabelecido, através de evidências clínicas, genéticas e epidemiológicas, que a elevação dos níveis plasmáticos de LDL constitui o maior fator de risco para a doença aterosclerótica (Batlouni, 1997 e Cooper et al., 2005). Entretanto, LDL nativas são reconhecidas, mas não se acumulam em quantidade apreciável nos macrófagos. A partícula deve ser modificada para que seja captada em quantidade suficiente para gerar as células espumosas (Batlouni, 1997).

O aumento de concentração de LDL nativa no interior da célula endotelial induz a um maior consumo de óxido nítrico e uma produção de radicais livres mais acentuada, o que leva a peroxidação dos ácidos graxos das partículas de LDL e, também a oxidação das proteínas apo-B. O aumento no contingente das LDLs oxidadas, induz a migração de monócitos e dá início à formação das células espumosas (Jorge,1997).

Vários estudos confirmam o papel da LDL oxidada na aterogênese. Alguns oxidantes podem ser originários de células como os macrófagos, células endoteliais ou células musculares lisas (Niki, 2004).

Admite-se que a liberação do ânion superóxido pelas células endoteliais e musculares lisas, no processo de formação de endoperóxidos cíclicos e prostaglandinas, pela via da ciclo-oxigenase, pode ser responsável pelo início da oxidação em algumas condições, enquanto a atividade aumentada da lipoxigenase em macrófagos poderia gerar aumento de hidroperóxidos lipídicos, sendo a participação da lipoxigenase no processo de peroxidação lipídica na parede arterial já está bem estabelecida (Batlouni, 1997).

A modificação oxidativa de LDL parece ocorrer em dois estágios. O primeiro, antes que os monócitos sejam ativados, resulta na oxidação dos lipídeos da LDL, com pequenas alterações na apo-B (LDL minimamente oxidada- MM-LDL-OX). O segundo começa quando os monócitos são ativados e convertidos em macrófagos, que contribuem com sua grande capacidade oxidativa. Nesse estágio, os lipídeos da LDL são adicionalmente oxidados e fração protéica (apo-B) também o é. Essas LDLs altamente oxidadas (LDL-OX) deixam de ser reconhecidas pelos receptores clássicos de LDL, porém são reconhecidas pelos receptores de LDL acetilados (removedores) e/ou receptores oxidados, que não são regulados pelo conteúdo celular de colesterol. Em conseqüência, ocorre o acúmulo maciço de colesterol, formando-se as células espumosas, que são a marca característica das estrias gordurosas (Batlouni, 1997).

A modificação oxidativa da LDL, além de induzir a captação aumentada pelos macrófagos, produz muitas moléculas modificadas, com efeitos biológicos diversos inclusive efeito acentuado na injúria endotelial e na ativação de células endoteliais. MM-LDL-OX induzem a produção, pelas células endoteliais, de potentes ativadores dos monócitos, como a proteína quimiotáxica para monócitos (MCP-1) e o fator estimulador das colônias de monócitos (M-CSF), os quais estimulam o crescimento e a diferenciação dos monócitos em macrófagos. Portanto, LDL oxidadas, além de transformarem macrófagos em células espumosas, aumentam a adesão, ativação e migração dos monócitos (Batlouni, 1997).

A LDL oxidada tem efeito citotóxico inibindo a proliferação e motilidade espontânea de células endoteliais da artéria coronária, esse efeito é proporcional à concentração e grau de oxidação da LDL (Xavier et al., 2004). Os produtos da oxidação de LDL, inclusive 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).

As lesões arteriais, conhecidas como placas, têm sido extensivamente caracterizadas em seis tipos principais de lesões que refletem estágios iniciais, evoluídos e maduros de doenças. Nos locais da artéria propensos a lesões, o engrossamento na camada íntima das artérias está entre as primeiras mudanças histológicas. Lesões do tipo II são formadas à medida que os macrófagos acumulam lipídios, gerando as células em espuma. Formações continuadas de células em espuma e necroses em macrófagos podem produzir lesões do tipo III que contém pequeno pool extracelular de lipídios. As lesões do tipo IV são definidas por uma separação relativamente fina de tecido entre o centro lipídico e o lúmen arterial enquanto lesões do tipo V exibem engrossamentos fibrosos dessa estrutura, também conhecida como lesão "cap". As lesões do tipo VI, maduras, exibem uma arquitetura mais complicada e são caracterizadas por áreas fibrosas calcificadas com visível ulceração, e possíveis hemorragias (Stocker e Keaney, Jr., 2004).

Aterosclerose é a maior fonte de morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos. A magnitude deste problema é profunda, pois a aterosclerose mata mais que todos os tipos de câncer combinados e os custos econômicos são consideráveis. Embora seja um problema de países desenvolvidos, a *World Health Organization* prediz que a prosperidade econômica global pode levar a uma epidemia de aterosclerose em países em desenvolvimento que possuem hábitos ocidentais (Stocker e Keaney, Jr., 2004) .

A taxa de mortalidade da cardiopatia isquêmica nos Estados Unidos está entre as mais altas do mundo, sendo seis vezes maior que a observada no Japão. Entretanto, os japoneses que migram para os Estados Unidos e adotam o estilo de vida e a dieta dos americanos adquirem a predisposição a doenças ateroscleróticas típicas da população norte-americana (Ribeiro e Shintaku,2004).

No Brasil, de todas as mortes estimadas para o ano de 1997, a aterosclerose correspondia a 34,10%, ocupando primeiro lugar entre os diversos tipos de mortalidade, segundo estimativa do Ministério da Saúde (Ribeiro e Shintaku, 2004) e anualmente cerca de 300 mil brasileiros são vítimas de aterosclerose e suas complicações (Costa, 2002).

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 fatores genéticos) e os modificáveis pelo estilo de vida (obesidade, hipertensão arterial, tabagismo, vida sedentária e hábito alimentar) (Scott, 2004).

Neste sentido, a busca de substâncias eficazes em reduzir os níveis de colesterol e de radicais livres é crescente. As propriedades e peculiaridades da bixina, aliadas a seu potencial antioxidante, a tornam um bom alvo de pesquisa para os eventos associados à hiperlipidemia e aterosclerose. Dessa forma, esse trabalho busca acrescentar à literatura, dados sobre o efeito da administração de um extrato oleoso de bixina sobre o perfil sérico de lipídeos, defesas antioxidantes e marcadores séricos de função hepática e renal em ratos.

# OBJETIVOS

# CAPÍTULOS 3 – OBJETIVOS

## 3.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da administração do extrato oleoso de bixina (P.A. Lipo 8%), sobre o perfil lipídico, defesas antioxidantes, funções hepática e renal, em ratos tratados com dietas padrão e hipercolesterolemiante.

## 3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Avaliar os efeitos do extrato oleoso de bixina em ratos machos tratados com dieta AOAC;

2- Avaliar os efeitos do extrato oleoso de bixina em ratos fêmeas tratados com dieta AOAC;

3- Avaliar os efeitos do extrato oleoso de bixina em ratos fêmeas tratados com dieta AIN-93;

4- Avaliar os efeitos do extrato oleoso de bixina sobre o perfil lipídico sérico, hepático e fecal;

5- Avaliar os efeitos do extrato oleoso de bixina sobre os parâmetros relacionados à atividade antioxidante;

6- Avaliar os efeitos do extrato oleoso de bixina sobre as funções hepática e renal.

# MATERIAL E MÉTODOS

# CAPÍTULO 4 – MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 - Animais e divisão dos grupos

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 32 ratos ***Fisher*** albinos machos e 64 ratas ***Fisher*** albinas, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram divididos em três experimentos:

Experimento I: 32 ratos ***Fisher*** albinos machos, divididos em 4 grupos de 8 animais;

Experimento II: 32 ratos ***Fisher*** albinos fêmeas, divididos em 4 grupos de 8 animais;

Experimento III: 32 ratos ***Fisher*** albinos fêmeas, divididos em 4 grupos de 8 animais.

Durante os experimentos, os animais foram mantidos em ambiente arejado, com controle de temperatura, umidade e ventilação. Todos os animais formam devidamente identificados com o tipo de dieta, o número específico do animal e com comedouro e bebedouros individualizados. Água e dietas foram oferecidas à vontade e durante o período experimental, foram realizadas semanalmente medidas de peso, de ingestão alimentar, desperdício e quantidade de fezes.

O experimento foi aprovado pelo Conselho de Ética da Universidade Federal de Ouro Preto-UFOP, sendo o manejo dos animais realizado de acordo com os princípios e diretrizes descritos no Canadian Council on Animal Care (1984).

## 4.2 - Dietas

Os animais foram alimentados com dietas, confeccionadas no Laboratório de Nutrição Experimental, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, sendo que a composição de cada dieta está descrita em cada experimento. As dietas foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e armazenadas em freezer durante o período experimental. Para o preparo das dietas utilizou-se mistura de sais e de

vitaminas preparadas no Laboratório de Nutrição Experimental, à partir dos compostos descritos abaixo:

Mistura de sais (expresso por g/kg da mistura): NaCl - 139,300/ KI - 0,790/ $MgSO_4.7H_2O$ - 57,300/ $CaCO_3$ - 381,400/ $MnSO_4.H_2O$ - 4,010/ $FeSO_4.7H_2O$ – 27,000/ $ZnSO_4.7H_2O$ - 0,548/ $CuSO_4.5H_2O$ - 0,477/ $CoCl_2.6H_2O$ - 0,023/ $KH_2PO_4$ - 389,000. Os sais foram adquiridos do Reagen, Rio de Janeiro, Brasil.

Mistura de vitaminas (expresso por em mg/kg da mistura): Acetato de retinol - 690; colecalciferol - 5; ácido *p*-aminobenzóico - 10.000; inositol - 10.000; niacina - 4.000; riboflavina - 800; cloridrato de tiamina - 500; ácido fólico - 200; biotina - 40; cianocobalamina - 3; *dl*-*α*-tocoferol – 6.700; sacarose - q.s.p. 1.000. As vitaminas foram adquiridas da Merk, Darmstadt, Alemanha.

## 4.3 – Experimentos

### 4.3.1 - Desenho experimental específico do experimento 1

Foram utilizados 32 ratos *Fisher* machos, albinos, com peso médio de aproximadamente 160 g. Os animais foram alimentados com dietas padrão segundo *Association of Official Agricultural Chemists* dos Estados Unidos da América (AOAC, 1965) ou dieta hipercolesterolemiante com 25% de óleo de soja e 1% de colesterol, suplementadas ou não com o extrato oleoso de bixina, conforme quadro 3.

O extrato oleoso de bixina (P.A.Lipo 8%) utilizado neste experimento foi um produto comercial gentilmente cedido pela Corantec Corantes Naturais Ltda. De acordo com o laudo do fornecedor (anexo I), o produto contém urucum dissolvido em óleo de soja vegetal, com teor de 8% de bixina, aspecto líquido lipossolúvel, cor vermelha alaranjada, sabor característico, densidade 0.95/0,99 20C umidade em % (0,30 MAX -4,00%) e resíduo seco em % (0,51).

Os animais foram distribuídos em quatro grupos. O grupo I recebeu dieta padrão AOAC, chamado de “Grupo Controle - (C)”. O grupo II recebeu a mesma dieta do grupo anterior, porém acrescida de 1,88% de extrato oleoso de bixina (0,15% de bixina). Este grupo foi chamado de “Grupo Controle + Bixina Oleosa - (CBO)”. O grupo III recebeu

uma dieta hipercolesterolemiante, denominado "Grupo Hiper - (H)". O grupo IV recebeu a mesma dieta do grupo anterior, porém acrescida de 1,88% de extrato oleoso de bixina (0,15% de bixina) e foi chamado de "Grupo Hiper + Bixina Oleosa - (HBO)". Os animais dos grupos I e II receberam inicialmente dieta controle e os animais dos grupos III e IV receberam dieta hipercolesterolemiante sem acréscimo do extrato, ambos por 15 dias para adaptação às dietas. Após este período, os animais passaram a receber as suas respectivas dietas por um período de 6 semanas, quando foram anestesiados e sacrificados. O peso inicial e final, o ganho de peso durante o experimento e a ingestão alimentar foram avaliados e as fezes da sétima semana de experimento foram coletadas para posterior dosagem de gorduras.

### 4.3.2 - Desenho experimental específico do experimento 2

Foram utilizados 32 ratos *Fisher* fêmeas, albinas com peso médio de aproximadamente 155 g, divididas em 4 grupos de oito animais por dieta testada, sendo os grupos, as dietas oferecidas e os procedimentos experimentais iguais ao do experimento 1.

Quadro 3 - Composição das dietas experimentais utilizadas nos experimentos 1 e 2 (g/Kg de dieta).

| | **C** | **CBO** | **H** | **HBO** |
|---|---|---|---|---|
| Colesterol | 0 | 0 | 10 | 10 |
| Colina | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Mistura de Vitaminas | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Celulose | 10 | 10 | 130 | 130 |
| Ext. Oleoso de Bixina* | 0 | 18,75 | 0 | 18,75 |
| Mistura de Minerais | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Óleo | 80 | 80 | 250 | 250 |
| Caseína | 120 | 120 | 120 | 120 |
| Amido Milho | 726 | 707,25 | 426 | 407,25 |
| Valor calórico (Kcal) | 4104 | 4197,75 | 4434 | 4577,75 |

*Extrato oleoso contendo 8% de bixina (*Corantec – Corantes Naturais Ltda*).

### 4.3.3 - Desenho experimental específico do experimento 3

Foram utilizados 32 ratos Fisher fêmeas, albinas com peso médio de aproximadamente 170 g, divididos em 4 grupos de oito animais por dieta testada, sendo os grupos e os procedimentos experimentais iguais aos dos experimentos 1 e 2. Para este experimento variou-se a dieta utilizada, sendo que a dieta controle (padrão) seguia as recomendações nutricionais do *American Institute of Nutrition* - AIN-93 (Reeves et al., 1993) e não mais da AOAC, conforme o Quadro 2.

Quadro 4 - Composição das dietas experimentais utilizadas no experimento 3 (g/Kg de dieta).

| | **C** | **CBO** | **H** | **HBO** |
|---|---|---|---|---|
| Colesterol | 0 | 0 | 10 | 10 |
| Colina | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Mistura de Vitaminas | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Celulose | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Ext. Oleoso de Bixina* | 0 | 18,75 | 0 | 18,75 |
| Mistura de Minerais | 35 | 35 | 35 | 35 |
| Óleo | 40 | 40 | 250 | 250 |
| Caseína | 140 | 140 | 140 | 140 |
| Amido Milho | 722,5 | 703,75 | 502,5 | 483,75 |
| Valor calórico (Kcal) | 3810 | 3903,75 | 4820 | 4913,75 |

*Extrato oleoso contendo 8% de bixina (*Corantec – Corantes Naturais Ltda*).

## 4.4 - Obtenção do soro e plasma

Ao final das 8 semanas de experimento realizou-se o sacrifício dos animais. Os animais foram deixados 8 horas em jejum, anestesiados com éter, sacrificados, o sangue foi coletado através do plexo braquial e colocados em tubos *eppendorf* (com 2,0 mL de capacidade) que posteriormente foi centrifugado a 13000 RPM por 15 minutos para obtenção do soro o qual foi guardado sob refrigeração (-4°C). Para as dosagens que necessitaram ser realizadas usando o plasma, 15µL de anticoagulante Glistab® (Labtest cat. 29) foi adicionado anteriormente ao eppendorf. As diversas dosagens bioquímicas foram realizadas imediatamente ou em até três dias.

O fígado, os rins, o baço e a gordura abdominal foram retirados no momento do sacrifício e pesados sendo que os fígados retirados foram congelados para posterior dosagem de gorduras.

## 4.5 - Dosagens Bioquímicas

Nos experimentos as dosagens bioquímicas foram realizadas utilizando-se de kits comerciais Labtest Diagnóstica S.A. sendo elas: Albumina, ALT, AST, Colesterol Total, Colesterol-HDL, Creatinina, Fosfatase alcalina (ALP), Glicose, Hemoglobina, Proteínas Totais, Triacilgliceróis e Uréia. Os princípios dos mesmos e seus respectivos protocolos são descritos no *anexo II.*

A concentração do colesterol não-HDL (colesterol VLDL e LDL) foi calculada a partir da diferença do colesterol total pelo colesterol HDL e expressa em mmol/L:

**Outras Frações do Colesterol (mmol/L) = Colesterol Total (mmol/L) – Colesterol HDL (mmol/L)**

Os parâmetros bioquímicos realizados sem o uso de kits comerciais foram Grupos Sulfidrilas e Paraoxonase (PON) cujos protocolos são descritos a seguir:

### 4.5.1 - Protocolo de dosagem de Paraoxonase

#### 4.5.1.1 - *Paraoxonase – Atividade arilesterase*

Tem como objetivo a determinação da atividade arilesterásica da enzima da paraoxonase, usando fenilacetato como substrato, conforme descrito por Beltowski et al., (2002) .

Em tubo de ensaio adicionou-se 2mL de tampão Tris-HCl, 9mM; pH = 8,0 contendo 0,9mmol/L de cloreto de cálcio e 5µL de soro, misturou-se no votes, incubou-se em banho-maria durante dois minutos e adicionou-se 0,5mL da solução Tris- fenilacetato (1 µL de fenilacetato para cada 1500 µL de Tris-HCl 9mM; pH = 8,0). Após exatamente 3 minutos,

a absorbância foi lida em 270nm. O espectrofotômetro foi zerado com o branco que continha todos os reagentes acima, exceto o soro.

Utilizamos a definição para atividade enzimática de acordo com Beltowski J. *et al.* (2002), onde 1U de paraoxonase é equivalente a hidrólise de 1mmol de fenilacetato ($\varepsilon$ = 1310 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$) por minuto (usualmente a atividade desta enzima é representada por 1mL de soro). Assim a atividade arilesterásica da enzima é:

$$U/mL = \frac{Absorvância}{\varepsilon \times b} \times \frac{1000}{Tempo \times Volume\ de\ soro}$$

Onde:

$\varepsilon$ – Coeficiente de extinção molar;

b – caminho óptico, igual a 10 mm.

**4.5.1.2** - *Paraoxonase – Atividade paraoxonase*

Tem como objetivo a determinação da atividade paraoxonase da enzima paraoxonase, usando paraoxon como substrato, tendo como base a velocidade de hidrólise deste, com a liberação do paranitrofenol por minuto, conforme descrito por Beltowski et al., (2002).

Inicialmente preparou-se uma solução contendo 9 mL de tampão glicina/NaOH 50mM; pH 10,5 contendo $CaCl_2$ 0,9 mM e 2µL de paraoxon. Posteriormente, em tubo de polipropileno adicionou-se 780 µL dessa solução e 20µL de soro. A solução foi homogeneizada e as absorbâncias das amostras lidas no espectrofotômetro a 412nm, exatamente a cada minuto, por 3 minutos. O branco (tubo com 780 µL da solução preparada inicialmente e 20 µL de água) foi utilizado para acertar o aparelho.

Segundo Beltowski J *et al* (2002) 1U da enzima paraoxonase é equivalente a hidrólise de 1mmol de paraoxon ($\varepsilon$ = 18290 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$) por minuto (usualmente a

atividade dessa enzima é representada em unidade por mL de soro). A atividade paraoxonase da enzima paraoxonase é:

$$U/mL = \frac{Absorvância}{a \times b} \times \frac{1000}{Tempo \times Volume\ de\ soro}$$

A absorbância utilizada nessa expressão é o delta obtido das três absorbâncias lidas (absorbância final – absorbância inicial / 2).

### 4.5.2 - Protocolo de dosagem dos grupos sulfidrilas

Tem com objetivo a determinação de grupos sulfidrilas totais, grupos sulfidrilas ligado às proteínas e grupos sulfidrilas em compostos de baixo peso molecular em amostras biológicas, usando o reagente de Ellman (DNTB) conforme proposto por Sedlak e Lindsay (1968). Os grupos tióis reagem com DNTB formando um complexo, que absorve luz à 412nm.

*Reagentes e formas de preparo*

- *Tampão Tris-HCl, pH = 8,2:* Foram dissolvidas 24,22g de Trizma Base (PM 121,1) e 8,32g de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA; PM416,21; 99% m/m) em 800mL de água destilada. O pH foi ajustado em 8,2 usando HCl 3 mol/L e água destilada foi adicionada para completar o volume final para 1.000mL. A solução final continha 30mmol/L de Trizma Base e 3mmol/L de EDTA.
- *Tampão Tris-HCl, pH = 8,9:* Foram dissolvidas 48,44g de Trizma Base ( PM 121,1) e 8,32g de EDTA (PM 416,21; 99% m/m) em 800mL de água destilada. O pH foi ajustado em 8,9 usando HCl 3 mol/L e água destilada foi utilizada para completar o volume final para 1000mL. A solução final continha 30mmol/L de Trizma Base e 3mmol/L de EDTA.

- *Cloreto de Trietanolamina*: Foram dissolvidos 1,33 mL de cloreto de trietanolamina (TEA; PM 185,7) e adicionou-se água destilada para completar o volume para 500mL.
- *Ácido Tricloroacético*: Foram dissolvidos 10 g de ácido tricloroacético (TCA; PM 163,4; 70% m/v; 1,63g/mL) em 70mL de água destilada. Agitou-se cuidadosamente e adicionou-se água destilada para completar o volume final para 100mL.
- *Ácido 5,5´-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico):* Foram dissolvidos 10mg de ácido 5,5´-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB; Reagente de Ellman; PM 396,3) em 14,71mL de metanol (PM 32,04; 0,79g/mL). Este reagente foi preparado pouco antes da dosagem e mantido armazenado no gelo durante a utilização.
- *Solução padrão estoque*: Foram dissolvidaos 12mg de cisteína (PM 121,16) em volume de TEA suficiente para 5mL. A solução final continha 20mmol/L de cisteína. Este reagente foi preparado pouco antes da dosagem e mantido armazenado no gelo durante a utilização.

O padrão de cisteína foi feito dissolvendo 50µL de solução padrão estoque em 950µL de TEA. E procedeu-se como se segue.

| TUBO | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CONC (µmol/L) | 0 | 50 | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Padrão Cisteína (µL) | 0 | 25 | 50 | 125 | 250 | 500 |
| TEA (µL) | 500 | 475 | 450 | 375 | 250 | 0 |

.

#### 4.5.2.1 - Procedimento de dosagem de sulfidrilas totais

Para cada amostra, adicionou-se 800µL de metanol, 150µL de Tris-HCl, pH = 8,2, 50µL de DTNB e 40µL de amostra (ou da série de padrões). Centrifugou-se a 13000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente. As absorbâncias das amostras foram determinadas em 412nm, a 25°C. Nesta dosagem são feitos dois brancos, o branco 1 que contém todos os reagentes menos a amostra e o branco 2 que não contém amostra e

DTNB. O branco 2 é utilizado para acertar o aparelho. E as absorbâncias obtidas de todas as amostras são diminuídas da absorbância obtida para o branco 1.

#### 4.5.2.2 - Procedimento de dosagem de sulfidrilas livres

Para cada amostra, adicionaram-se 200µL de TCA e 200µL de amostra. Esta mistura foi agitada e centrifugada por 15 minutos a 13000rpm em temperatura ambiente, para que as proteínas precipitassem. Adicionaram-se a um outro tubo de polipropileno, 150µL do sobrenadante, 600µL de Tris-HCl pH 8,9 e 60µL de DTNB. As absorbâncias das amostras foram determinadas em 412nm. Nesta dosagem são feitos dois brancos, o branco 1 que contém todos os reagentes menos a amostra e o branco 2 que não contém amostra e DTNB. O branco 2 é utilizado para acertar o aparelho. E as absorbâncias obtidas de todas as amostras são diminuídas da absorbância obtida para o branco 1.

#### 4.5.2.3 – Cálculos para determinação das concentrações de sulfidrilas totais, livres e ligadas à proteínas

Foi feito um gráfico expressando Concentração do padrão (Eixo *Y*) x Absorbância do padrão (Eixo *X*). Após análise de uma regressão linear da curva padrão, obteve-se a equação da reta (Concentração = a* Absorbância + b) que foi utilizada para determinar a concentração de sulfidrilas totais e de sulfidrilas livres.

A concentração dos radicais sulfidrilas ligados às proteínas foi calculada pela diferença entre sulfidrilas totais e sulfidrilas livres. Todas as concentrações foram expressas em µmol/L.

### 4.6 – Extração de gordura do fígado e das fezes

Amostras dos fígados e das fezes dos animais foram previamente secas em estufa ventilada e a extração dos lipídios totais das amostras foi realizada segundo metodologia proposta pela *Association of Official Agricultural Chemists* dos Estados Unidos da América (AOAC, 1980). Amostras de fígado foram deixadas por 8 horas sob refluxo no aparelho de

extração (Sohxlet) e amostras de fezes por 5 horas. 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.

### 4.7 – Dosagens de colesterol total e triacilgliceróis na gordura do fígado

Diluições da gordura hepática em isopropanol foram preparadas anteriormente aos procedimentos de dosagens. Diluições de 1:50 foram preparadas a partir da homogenização de 20 µL de gordura em 980µL em isopropanol e diluições de 1:100 foram preparadas à partir de alíquotas conhecidas da diluição de 1:50 em isopropanol. As diluições de 1:50 foram utilizadas para todas as dosagens de triacilgliceróis e para as dosagens de colesterol total dos grupos C e CBO e as diluições de 1:100 foram utilizadas na dosagem de colesterol total dos grupos H e HBO.

As dosagens foram realizadas a partir de 10µL de diluição de acordo com os protocolos descritos para dosagem de colesterol total e de triacilgliceróis (anexo II) e expressas em mg de colesterol (ou triacilglicerol) / g de fígado.

### 4.8 – Dosagens de colesterol total e triacilgliceróis na gordura das fezes

Diluições da gordura fecal em isopropanol foram preparadas anteriormente aos procedimentos de dosagens. A partir da homogenização de 20 µL de gordura em 980µL em isopropanol foram preparadas diluições de 1:50. Diluições de 1:100 e 1:200 foram preparadas à partir de alíquotas conhecidas da diluição de 1:50 em isopropanol. As diluições de 1:50 foram utilizadas para todas as dosagens de triacilgliceróis e para as dosagens de colesterol total dos grupos C e CBO, as diluições de 1:100 foram utilizadas na dosagem de colesterol total do grupos H e as diluições de 1:200 foram utilizadas na dosagem de colesterol total do grupo HBO.

As dosagens foram realizadas a partir de 10µL de diluição de acordo com os protocolos descritos para dosagem de colesterol total e de triacilgliceróis (anexo 1) e expressas em mg de colesterol (ou triacilglicerol) / g de fezes.

### 4.9 - Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Empregou-se o método de análise de variância bivariada (two-way ANOVA) para a análise descritiva dos dados. Quando as alterações eram significativas, ($p < 0,05$), foi realizado o teste de Tukey a fim de se determinar as diferenças específicas entre as médias.

# RESULTADOS

# CAPÍTULO 5 – RESULTADOS

## 5.1) RESULTADOS DO EXPERIMENTO 1

### 5.1.1) Avaliação nutricional

A tabela 2 apresenta os valores de massa corporal dos animais após adaptação às dietas, ingestão total e massa corporal dos animais ao final do experimento.

Após o período de adaptação, observou-se que a massa corporal dos animais foi influenciada pela dieta. Os animais que receberam dietas controle C (174,71 ± 14,69) e CBO (172,1 ± 10,88) apresentaram maiores massas em comparação aos animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes H (164,56 ± 13,71) e HBO (161,89 ± 15,85).

A dieta e o tratamento com a bixina influenciaram os valores de ingestão alimentar. Os animais que receberam as dietas controle ingeriram, em média, mais alimento que os animais que receberam as dietas hipercolesterolemiantes e os animais que receberam bixina em suas dietas ingeriram menos alimentos que os animais que não receberam o tratamento com o carotenóide. Além disto, houve interação entre estes dois fatores (dieta e bixina) e os dados nos mostram que a ingestão foi maior para os animais do grupo C (461,55 ± 48,90), seguida dos animais do grupo H (394,01 ± 48,30). Os animais dos grupos CBO (123,95 ± 17,66) e HBO (117,05 ± 23,78) apresentaram os menores valores de ingestão entre os grupos e foram estatisticamente iguais entre si.

Os animais que receberam as dietas hipercolesterolemiantes e os tratamentos com bixina apresentaram menor massa corporal ao final do experimento se comparados aos animais que receberam dietas controle e tratamento isento de bixina.

*Tabela 2 - Massa corporal após adaptação às dietas, ingestão total, ganho de massa total e massa corporal final de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO,) dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Massa Corporal (g) | Ingestão Total (g) | Massa Final (g) |
|---|---|---|---|
| **C** | 174,71 ± 14,69 | 461,55 ± 48,90 [a] | 208,06 ± 12,03 |
| **CBO** | 172,10 ± 10,88 | 123,95 ± 17,66 [c] | 189,71 ± 12,99 |
| **H** | 164,56 ± 13,71 | 394,01 ± 48,30 [b] | 187,17 ± 32,20 |
| **HBO** | 161,89 ± 15,85 | 117,05 ± 23,78 [c] | 177,91 ± 17,33 |
| **Valor de P** | | | |
| **Dieta** | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| **Bixina** | >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).*

### 5.1.2) Peso dos órgãos

5.2.1.1) Pesos total e relativo dos rins e do baço

A tabela 3 apresenta os valores de peso total e peso relativo para os rins e baço

Não houve diferença entre os grupos para os valores de peso total e relativo dos rins e nem para os valores de peso relativo do baço.

Para o peso total do baço, os animais que receberam tratamento com a bixina apresentaram os menores valores se comparados aos animais isentos desse tratamento. Houve interação entre dieta e bixina. Os animais dos grupos C (0,40 ± 0,04) e H (0,41 ± 0,04) foram estatisticamente iguais entre si apresentando os maiores pesos, os animais do grupo CBO foram estatisticamente iguais aos animais dos grupos C, H e HBO e os animais do grupo HBO (0,34 ± 0,05) apresentaram os menores valores de peso do baço.

*Tabela 3 – Peso total e peso relativo (peso total do órgão / peso do anima x 100) dos rins e do baço de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Rins (g) | Peso relativo dos rins (g) | Baço (g) | Peso relativo do baço (g) |
|---|---|---|---|---|
| **C** | 1,17 ± 0,14 | 0,56 ± 0,04 | 0,40 ± 0,04 [a] | 0,19 ± 0,01 |
| **CBO** | 1,15 ± 0,12 | 0,60 ± 0,04 | 0,39 ± 0,05 [a,b] | 0,21 ± 0,03 |
| **H** | 1,09 ± 0,09 | 0,60 ± 0,14 | 0,41 ± 0,04 [a] | 0,23 ± 0,06 |
| **HBO** | 1,09 ± 0,09 | 0,62 ± 0,03 | 0,34 ± 0,05 [b] | 0,19 ± 0,03 |
| | | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 |
| **Bixina** | >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).*

5.1.2.2) Pesos total e relativo do fígado e da gordura abdominal

A tabela 4 apresenta os valores de peso total e peso relativo para o fígado e gordura abdominal.

O peso total do fígado foi influenciado pela dieta e pela bixina. Os animais que receberam as dietas hipercolesterolemiantes e os animais que receberam tratamento isento de bixina apresentaram fígados mais pesados quando comparados aos animais que receberam dietas controle e tratamento com a bixina. A dieta hipercolesterolemiante influenciou também o peso relativo deste órgão elevando os seus valores.

Para a gordura abdominal, a dieta influenciou tanto os valores de peso total quanto de peso relativo. Os animais que receberam as dietas controle apresentaram maiores valores de peso se comparados aos animais que receberam as dietas hipercolesterolemiantes.

*Tabela 4 – Peso total e peso relativo (peso total do órgão / peso do animal x 100) do fígado e da gordura abdominal de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Fígado (g) | Peso relativo do fígado (g) | Gordura abdominal (g) | Peso relativo da gordura abdominal (g) |
|---|---|---|---|---|
| **C** | 5,14 ± 0,46 | 2,47 ± 0,12 | 5,33 ± 1,68 | 2,56 ± 0,80 |
| **CBO** | 4,83 ± 0,30 | 2,55 ± 0,16 | 5,77 ± 3,45 | 2,98 ± 1,62 |
| **H** | 7,24 ± 0,61 | 3,99 ± 0,89 | 3,58 ± 1,62 | 1,92 ± 0,74 |
| **HBO** | 6,70 ± 0,85 | 3,77 ± 0,33 | 3,54 ± 2,12 | 1,92 ± 0,95 |
| | | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| **Bixina** | <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).*

### 5.1.3) Perfil lipídico

5.1.3.1) Perfil lipídico sérico

A tabela 5 apresenta os resultados do perfil lipídico sérico dos animais.

Os níveis séricos de colesterol total foram influenciados pela dieta e pela bixina. A análise da interação desses fatores revelou que a dieta hipercolesterolemiante H (6,98 ± 1,02) elevou em mais que três vezes (em relação ao grupo controle) a concentração sérica do colesterol total. A associação de bixina à essa dieta reduziu estes valores sendo responsável por uma redução de 41% da concentração sérica do colesterol total dos animais do grupo HBO (4,09 ± 1,06). Entretanto, este efeito mostrou-se limitado, uma vez que ela não modificou os níveis de colesterol sérico dos animais quando foi associada à dieta controle, já que C (2,11 ± 0,11) e CBO (2,65 ± 0,39) foram estatisticamente iguais entre si.

A fração HDL foi maior nos grupos de animais que receberam as dietas controle em comparação aos grupos que receberam dietas hipercolesterolemiantes e também foi maior para os grupos de animais que tiveram a bixina acrescida em suas dietas. A análise da interação da dieta com a bixina revelou que a adição de bixina à dieta controle provocou

uma elevação de 45% dos níveis séricos do colesterol HDL nos animais do grupo CBO (2,19 ± 0,28), que obtiveram maiores concentrações se comparados aos animas que receberam a dieta controle isenta de bixina C (1,51 ± 0,17). Entretanto esse efeito não foi observado na dieta hipercolesterolemiante, uma vez que os animais dos grupos H (0,46 ± 0,08) e HBO (0,56 ± 0,25) foram estatisticamente iguais entre si e apresentaram os menores níveis de HDL.

O colesterol não-HDL, bem como índice aterogênico, seguiram o mesmo padrão estatístico encontrado para o colesterol total. A associação de bixina à dieta hipercolesterolemiante foi responsável por uma redução significativa dos níveis de colesterol não - HDL e índice aterogênico no grupo HBO em comparação aos animais do grupo H (redução de aproximadamente 46% e 54% respectivamente). Quanto aos triacilgliceróis observamos que a adição de bixina às dietas foi a responsável pela redução dos níveis séricos deste parâmetro nos animais dos grupos CBO e HBO.

*Tabela 5 - Concentrações séricas do colesterol total, colesterol HDL, colesterol não-HDL (*Cn-HDL*), índice aterogênico e triacilgliceróis de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Colesterol total (mmol/L) | Colesterol HDL (mmol/L) | Cn-HDL (mmol/L) | Índice Aterogênico* | Triacilgliceróis (mmol/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| **C** | 2,11 ± 0,11 [c] | 1,51 ± 0,17 [b] | 0,6 ± 0,16 [c] | 0,54 ± 0,43 [c] | 1,24 ± 0,30 |
| **CBO** | 2,65 ± 0,39 [c] | 2,19 ± 0,28 [a] | 0,45 ± 0,25 [c] | 0,21 ± 0,12 [c] | 0,72 ± 0,25 |
| **H** | 6,98 ± 1,02 [a] | 0,46 ± 0,08 [c] | 6,52 ± 1,05 [a] | 14,88 ± 4,74 [a] | 1,25 ± 0,84 |
| **HBO** | 4,09 ± 1,06 [b] | 0,56 ± 0,25 [c] | 3,52 ± 0,95 [b] | 6,85 ± 1,81 [b] | 0,50 ± 0,22 |
| | | | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 | >0,05 |
| **Bixina** | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 |
| **Interação** | < 0,05 | < 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).*
** Índice aterogênico = (Cn - HDL) x (Colesterol HDL)* $^{-1}$.

5.1.3.2) Perfil lipídico hepático e fecal

A tabela 6 indica a porcentagem de gordura hepática e fecal.

As dietas hipercolesterolemiantes, em comparação às dietas controles, elevaram o percentual tanto de gordura hepática quanto de gordura fecal. A adição de bixina à dieta hipercolesterolemiante reduziu as porcentagens de gordura hepática e fecal dos animais do grupo HBO em 21% e 32% respectivamente, entretanto, a sua adição á dieta controle não proporcionou qualquer alteração, uma vez que essas porcentagens nos grupos C e CBO foram estatisticamente iguais entre si.

*Tabela 6 – % de gordura hepática e fecal de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | % de gordura hepática | % de gordura fecal |
|---|---|---|
| **C** | 9,82 ± 0,75 [c] | 3,85 ± 0,74 [c] |
| **CBO** | 10,81 ± 2,1 [c] | 3,94 ± 0,94 [c] |
| **H** | 46,5 ± 1,42 [a] | 17,69 ± 2,88 [a] |
| **HBO** | 36,75 ± 5,32 [b] | 12,36 ± 1,09 [b] |
| **Valor de P** | | |
| **Dieta** | < 0,05 | < 0,05 |
| **Bixina** | < 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).*

### 5.1.4) Parâmetros relacionados ao metabolismo hepático e renal

A tabela 7 apresenta os valores das atividades da ALT, AST, ALP e as concentrações séricas da uréia.

A dieta e o tratamento influenciaram a atividade de ALT, os animais que receberam as dietas controle, bem como os animais isentos do tratamento com a bixina apresentaram maior atividade dessa enzima, comparados aos animais que receberam as dietas hipercolesterolemiantes e tratamento com o carotenóide. A interação entre dieta e bixina nos revelou uma redução da atividade dessa enzima hepática quando esta foi associada à dieta hipercolesterolemiante, onde os animais do grupo HBO (1,24 ± 0,18) apresentaram uma menor atividade, enquanto os animais dos grupos C (1,75 ± 0,21), CBO (1,81 ± 0,29) e

H (1,94 ± 0,25) foram estatisticamente iguais entre si e apresentaram maiores níveis de atividade de ALT.

A atividade de AST foi influenciada pela dieta e pelo tratamento. As dietas hipercolesterolemiantes provocaram um aumento da atividade dessa enzima, ao passo que o tratamento com a bixina provocou uma redução. Pela análise da interação entre dieta e bixina, pôde se observar que a bixina reduziu a atividade de AST estando associada tanto á dieta controle quanto à dieta hipercolesterolemiante. Os animais dos grupos CBO (0,4 ± 0,28) e HBO (2,35 ± 0,33), apresentaram os menores níveis de atividade dessa enzima ao passo que os animais dos grupos C (2,76 ± 0,29) e H (3,04 ± 0,23) foram estatisticamente iguais entre si e apresentando as maiores atividades.

A atividade da fosfatase alcalina foi influenciada pela dieta e pela bixina. Os animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes e tratamento com bixina apresentaram maiores níveis de ALP se comparados aos animais que receberam dietas controle e tratamento isento de bixina.

Para os níveis de uréia sérica, houve influência apenas da bixina. O tratamento com o carotenóide foi o responsável pelas menores concentrações de uréia nos animais dos grupos CBO e HBO se comparados aos animais dos grupos C e H.

*Tabela 7 – Atividades das enzimas séricas ALT, AST e ALP e concentração sérica da uréia de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | ALT (U/L) | AST (U/L) | ALP (U/L) | Uréia (mmol/L) |
|---|---|---|---|---|
| **C** | 1,75 ± 0,21 [a] | 2,76 ± 0,29 [a] | 23,27 ± 5,83 | 5,53 ± 1,04 |
| **CBO** | 1,81 ± 0,29 [a] | 0,40 ± 0,28 [c] | 52,03 ± 7,03 | 3,90 ± 0,55 |
| **H** | 1,94 ± 0,25 [a] | 3,04 ± 0,23 [a] | 39,02 ± 8,42 | 5,56 ± 1,42 |
| **HBO** | 1,24 ± 0,18 [b] | 2,35 ± 0,33 [b] | 79,53 ± 21,51 | 2,96 ± 0,62 |
| | | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 | >0,05 |
| **Bixina** | < 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).*

### 5.1.5) Defesas antioxidantes

A tabela 8 apresenta os valores das concentrações dos grupos sulfidrilas totais, livres e ligados a proteínas.

A dieta influenciou as concentrações dos grupos sulfidrilas ligados à proteínas, o tratamento influenciou as concentrações dos grupos sulfidrilas livres e ambos influenciaram as concentrações dos grupos de sulfidrilas totais.

As dietas hipercolesterolemiantes reduziram as concentrações dos grupos sulfidrilas totais e dos grupos sulfidrilas ligados às proteínas e o tratamento com a bixina aumentou as concentrações dos grupos sulfidrilas totais e livres.

*Tabela 8 – Concentrações séricas de sulfidrilas totais, livres e ligadas à proteínas de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Sulfidrilas totais (μmol/L) | Sulfidrilas livres (μmol/L) | Sulfidrilas ligadas à proteínas (μmol/L) |
|---|---|---|---|
| **C** | 443,15 ± 65,69 | 21,00 ± 7,40 | 422,15 ± 62,63 |
| **CBO** | 526,36 ± 129,58 | 82,82 ± 16,98 | 443,55 ± 133,74 |
| **H** | 314,38 ± 100,46 | 32,19 ± 11,36 | 282,19 ± 100,51 |
| **HBO** | 412,98 ± 64,57 | 76,66 ± 26,15 | 336,32 ± 68,33 |
| **Valor de P** | | | |
| **Dieta** | < 0,05 | >0,05 | < 0,05 |
| **Bixina** | < 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).*

### 5.1.6) Glicose, proteínas totais e albumina

A tabela 9 apresenta as concentrações de glicose, proteínas totais e albumina.

A dieta hipercolesterolemiante e o tratamento com bixina reduziram as concentrações de glicose. Houve interação entre a dieta e o tratamento para este parâmetro. Os animais do grupo C (6,70 ± 1,11) apresentaram as maiores concentrações de glicose e

foram estatisticamente diferentes dos demais grupos, que apresentaram menores concentrações e foram estatisticamente iguais entre si: CBO (4,69 ± 0,38), H (4,72 ± 0,6), e HBO (4,99 ± 0,89). O mesmo padrão foi observado para a concentração de albumina.

Houve efeito da bixina sobre o parâmetro proteínas totais. Analisando a interação da dieta com a bixina, observamos que a adição da bixina à dieta hipercolesterolemiante, reduziu a concentração das proteínas nos animais dos grupos HBO (55,61 ± 4,6) em comparação aos animais do grupo H (66,66 ± 4,26), que ficaram isentos do tratamento. Além disso, os animais do grupo H apresentaram as maiores concentrações de proteínas, e foram estatisticamente semelhantes aos animais do grupo C (64,96 ± 2,91). Os animais do grupo CBO (60,43 ± 4,34), foram estatisticamente semelhantes aos animais dos grupos C e HBO.

*Tabela 9 – Concentrações séricas de glicose, proteínas totais e albumina de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Glicose (mmol/L) | Proteínas Totais (g/L) | Albumina (μmol/L) |
|---|---|---|---|
| **C** | 6,70 ± 1,11 [a] | 64,96 ± 2,91 [a,b] | 531,85 ± 36,91[a] |
| **CBO** | 4,69 ± 0,38 [b] | 60,43 ± 4,34 [b,c] | 415,68 ± 61,65[b] |
| **H** | 4,72 ± 0,6 [b] | 66,66 ± 4,26 [a] | 427,05 ± 52,67 [b] |
| **HBO** | 4,99 ± 0,89 [b] | 55,61 ± 4,60 [c] | 404,48 ± 69,77 [b] |
| | | **Valor de P** | |
| **Dieta** | < 0,05 | >0,05 | < 0,05 |
| **Bixina** | < 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).*

## 5.2) RESULTADOS DO EXPERIMENTO 2

### 5.2.1) Avaliação nutricional

A tabela 10 apresenta os valores de massa corporal inicial e após a adaptação às dietas, ingestão total e massa corporal dos animais ao final do experimento.

Não houve diferença de peso entre os grupos de animais ao início do experimento nem após o período de adaptação às dietas.

O tratamento com a bixina influenciou a ingestão alimentar e massa corporal final dos animais. Os animais que receberam a bixina em suas dietas ingeriram em média, menos alimentos que os animais que não receberam o tratamento e tiveram ao final do experimento menor massa corporal. A dieta também influenciou os valores de massa corporal final, sendo que os animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes obtiveram maiores pesos ao final do experimento se comparados aos animais que receberam as dietas controle.

*Tabela10 - Massa corporal inicial e após 15 dias de adaptação às dietas, ingestão total, ganho de massa total e massa corporal final de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Massa Corporal (g) | Massa Corporal após 15 dias (g) | Ingestão Total (g) | Massa Final (g) |
|---|---|---|---|---|
| **C** | 155,00 ± 10,58 | 183,69 ± 9,11 | 561,41 ± 347,73 | 179,73 ± 14,27 |
| **CBO** | 156,19 ± 10,88 | 182,55 ± 18,23 | 268,93 ± 171,9 | 117,98 ± 17,59 |
| **H** | 156,18 ± 8,92 | 183,19 ± 12,49 | 382,48 ± 173,98 | 192,83 ± 28,08 |
| **HBO** | 156,36 ± 7,56 | 182,07 ± 25,27 | 295,78 ± 131,52 | 142,30 ± 17,15 |
| | | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | >0,05 | >0,05 | >0,05 | <0,05 |
| **Bixina** | >0,05 | >0,05 | <0,05 | <0,05 |
| **Tratamento** | >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).*

### 5.2.2) Peso dos órgãos

5.2.2.1) Pesos total e relativo dos rins e do baço

A tabela 11 apresenta os valores de peso total e peso relativo para os rins e baço.

Não houve diferença entre os grupos para o peso total do rim e o tratamento com bixina influenciou o peso relativo desse órgão. Analisando a interação da dieta com a bixina, observamos que os animais do grupo CBO apresentaram os maiores valores de peso relativo dos rins CBO (0,94 ± 0,21) em comparação com os demais grupos C (0,59 ± 0,06), H (0,62 ± 0,07) e HBO (0,76 ± 0,08) que foram estatisticamente iguais entre si.

A dieta e a bixina influenciaram o peso total do baço. Os animais que receberam as dietas hipercolesterolemiantes apresentaram maiores valores de peso total do baço em comparação aos animais que receberam as dietas controle e os animais que receberam tratamento com bixina obtiveram menores valores comparados aos animais que não receberam o tratamento. Além disso, houve efeito da bixina para o peso relativo do baço, onde os animais que receberam suplementação de bixina às dietas apresentaram os menores valores de peso relativo desse órgão.

*Tabela 11 – Peso total e peso relativo (peso total do órgão / peso do animal x 100) dos rins e do baço de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Rins (g) | Peso relativo dos rins (g) | Baço (g) | Peso relativo do baço (g) |
|---|---|---|---|---|
| **C** | 1,06 ± 0,09 | 0,59 ± 0,06 [b] | 0,34 ± 0,05 | 0,19 ± 0,03 |
| **CBO** | 1,08 ± 0,09 | 0,94 ± 0,21 [a] | 0,19 ± 0,08 | 0,16 ± 0,06 |
| **H** | 1,18 ± 0,12 | 0,62 ± 0,07 [b] | 0,41 ± 0,11 | 0,21 ± 0,03 |
| **HBO** | 1,08 ± 0,16 | 0,76 ± 0,08 [b] | 0,25 ± 0,05 | 0,17 ± 0,02 |
| | | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | >0,05 | >0,05 | <0,05 | >0,05 |
| **Bixina** | >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).*

5.2.2.2) Pesos total e relativo do fígado e da gordura abdominal

A tabela 12 apresenta os valores de peso total e peso relativo para o fígado e gordura abdominal.

O peso total do fígado foi influenciado pela dieta e pela bixina. Os animais que receberam as dietas hipercolesterolemiantes e os animais que receberam tratamento isento de bixina apresentaram fígados mais pesados quando comparados aos animais que receberam dietas controle e tratamento com a bixina. A dieta hipercolesterolemiante influenciou também o peso relativo deste órgão elevando os seus valores.

Para a gordura abdominal, o tratamento com bixina influenciou tanto os valores de peso total quanto de peso relativo. Os animais que receberam bixina em suas dietas apresentaram os menores valores de peso total e relativo da gordura abdominal se comparados aos animais que não receberam o tratamento.

*Tabela 12 – Peso total e peso relativo (peso total do órgão / peso do animal x 100) do fígado e da gordura abdominal de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Fígado (g) | Peso relativo do fígado (g) | Gordura abdominal (g) | Peso relativo da gordura abdominal (g) |
|---|---|---|---|---|
| **C** | 4,80 ± 0,52 | 2,68 ± 0,37 | 5,18 ± 1,96 | 2,83 ± 0,91 |
| **CBO** | 3,35 ± 0,44 | 2,88 ± 0,45 | 0,33 ± 0,46 | 0,25 ± 0,33 |
| **H** | 9,06 ± 1,28 | 4,72 ± 0,38 | 7,43 ± 3,79 | 3,67 ± 1,58 |
| **HBO** | 6,81 ± 1,07 | 4,79 ± 0,47 | 0,95 ± 1,17 | 0,64 ± 0,77 |
| | | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | <0,05 | <0,05 | >0,05 | >0,05 |
| **Bixina** | <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).*

### 5.2.3) Perfil lipídico

5.2.3.1) Perfil lipídico sérico

A tabela 13 apresenta os resultados do perfil lipídico sérico dos animais.

A dieta e a bixina influenciaram os níveis séricos de colesterol total. As dietas hipercolesterolemiantes provocaram um aumento do colesterol total em comparação com as dietas controle e o tratamento com a bixina provocou uma redução destes níveis.

Dieta e bixina também influenciaram os níveis séricos do colesterol HDL. A fração HDL foi maior nos grupos de animais que receberam as dietas controle em comparação aos grupos que receberam dietas hipercolesterolemiantes e também foi maior para os grupos de animais que tiveram a bixina acrescida em suas dietas. A análise da interação da dieta com a bixina revelou que a adição de bixina à dieta hipercolesterolemiante provocou uma elevação expressiva (cerca de 5 vezes) dos níveis séricos do colesterol HDL nos animais do grupo HBO (1,58 ± 0,22), que obtiveram concentrações estatisticamente semelhantes aos animais dos grupos controle: C (1,38 ± 0,18) e CBO (1,19 ± 0,20). Essas alterações do colesterol HDL refletiram no índice aterogênico, onde os animais do grupo H (16,36 ± 6,82) apresentaram maior índice, sendo os demais grupos estatisticamente iguais entre si.

As dietas hipercolesterolemiantes elevaram as concentrações das frações não-HDL do colesterol e a adição de bixina às dietas, provocou uma redução destas concentrações. Este efeito, entretanto, foi observado sob uma forma limitada, já que esta redução ocorreu apenas quando a bixina foi associada à dieta hipercolesterolemiante (redução de aproximadamente 53%), não ocorrendo quando ela foi adicionada à dieta controle, já que os animais do grupo CBO (2,65 ± 0,39) foram estatisticamente iguais aos animais do grupo C (2,11 ± 0,11).

Quanto aos triacilgliceróis observamos a influência da bixina. A sua adição à dieta hipercolesterolemiante provocou uma elevação (de mais de duas vezes) nos níveis séricos deste parâmetro nos animais do grupo HBO (1,07 ± 0,10), enquanto nenhum efeito foi

observado a partir de sua adição à dieta controle sendo os animais dos grupos controle C (0,69 ± 0,11) e CBO (0,73 ± 0,17) estatisticamente iguais entre si.

*Tabela 13 - Concentrações séricas do colesterol total, colesterol HDL, colesterol não-HDL (*Cn-HDL*), índice aterogênico e triacilgliceróis de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Colesterol total (mmol/L) | Colesterol HDL (mmol/L) | Cn-HDL (mmol/L) | Índice Aterogênico* | Triacilgliceróis (mmol/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| **C** | 2,21 ± 0,46 | 1,38 ± 0,18 [a] | 0,83 ± 0,38 [c] | 0,60 ± 0,26 [b] | 0,69 ± 0,11 [b] |
| **CBO** | 1,89 ± 0,34 | 1,19 ± 0,20 [a] | 0,70 ± 0,27 [c] | 0,61 ± 0,26 [b] | 0,73 ± 0,17 [b] |
| **H** | 5,26 ± 1,80 | 0,32 ± 0,06 [b] | 4,94 ± 1,83 [a] | 16,36 ± 6,82 [a] | 0,50 ± 0,07 [c] |
| **HBO** | 3,92 ± 0,61 | 1,58 ± 0,22 [a] | 2,34 ± 0,55 [b] | 1,50 ± 0,40 [b] | 1,07 ± 0,10 [a] |
| | | | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | >0,05 |
| **Bixina** | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| **Interação** | >0,05 | <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).*
** Índice aterogênico = (Cn - HDL) x (Colesterol HDL)* $^{-1}$.

5.2.3.2) Perfil lipídico hepático

A Tabela 14 indica os valores da porcentagem de gordura no fígado e as concentrações hepáticas de colesterol total e triacilgliceróis.

A dieta e a bixina influenciaram o percentual de gordura e a concentração hepática de colesterol total. As dietas hipercolesterolemiantes provocaram um aumento nos valores destes parâmetros em comparação com as dietas controle e o tratamento com a bixina provocou uma redução. Este efeito, entretanto, foi observado sob uma forma limitada, já que esta redução (-43%) ocorreu apenas quando a bixina foi associada à dieta hipercolesterolemiante, a sua adição á dieta controle não proporcionou qualquer alteração, sendo os grupos C e CBO estatisticamente iguais entre si para ambos os parâmetros analisados.

Dieta e bixina também influenciaram as concentrações hepáticas de triacilgliceróis que foram maiores nos grupos de animais que receberam as dietas hipercolesterolemiantes em comparação aos grupos que receberam dietas controle e maiores para os grupos de animais que não tiveram a bixina acrescida em suas dietas em comparação com aqueles que tiveram. A análise da interação da dieta com a bixina revelou que a adição de bixina à dieta hipercolesterolemiante provocou uma redução de 60% na concentração de triacilgliceróis nos animais do grupo HBO, que obtiveram concentrações estatisticamente semelhantes aos animais dos grupos C e CBO.

*Tabela 14 – Porcentagem de gordura hepática e concentrações de colesterol total e triacilgliceróis no fígado de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | % de gordura | Colesterol | Triglicérides |
|---|---|---|---|
| **C** | 12,17 ± 3,56 [c] | 6,87 ± 0,77 [c] | 15,26 ± 2,76 [b] |
| **CBO** | 7,83 ± 3,14 [c] | 3,63 ± 0,59 [c] | 7,76 ± 3,61 [b] |
| **H** | 50,1 ± 5,59 [a] | 168,52 ± 12,02 [a] | 40,81 ± 12,86 [a] |
| **HBO** | 36,58 ± 7,48 [b] | 96,59 ± 14,28 [b] | 16,16 ± 4,64 [b] |
| | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| **Bixina** | <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).*

5.2.3.3) Perfil lipídico fecal

A Tabela 15 indica os valores da porcentagem de gordura das fezes e as concentrações fecais de colesterol total e triacilgliceróis.

A dieta e a bixina influenciaram o percentual de gordura fecal. As dietas hipercolesterolemiantes e o tratamento com a bixina provocaram elevações neste percentual em comparação com as dietas controle e tratamentos isentos de bixina.

Dieta e bixina influenciaram a concentração de colesterol total e triacilgliceróis nas fezes, e como ocorrido no fígado, a adição de bixina, á dieta hipercolesterolemiante

provocou uma redução de 42% na concentração do colesterol total e de 80% na concentração de triacilgliceróis dos animais do grupo HBO.

*Tabela 15 – Porcentagem de gordura fecal e concentrações de colesterol total e triacilgliceróis nas fezes de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | % de gordura | Colesterol | Triglicérides |
|---|---|---|---|
| **C** | 2,41 ± 0,61 | 2,93 ± 0,58 [c] | 1,92 ± 0,51 [b] |
| **CBO** | 6,34 ± 2,09 | 5,85 ± 1,59 [c] | 4,24 ± 2,17 [b] |
| **H** | 13,22 ± 2,37 | 75,03 ± 16,07 [a] | 19,31 ± 2,73 [a] |
| **HBO** | 14,83 ± 2,5 | 44,07 ± 5,14 [b] | 3,93 ± 1,14 [b] |
| | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| **Bixina** | <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).*

### 5.2.4) Parâmetros relacionados ao metabolismo hepático e renal

5.2.4.1) Parâmetros da função hepática

A tabela 16 apresenta os valores das atividades das enzimas ALT, AST e ALP.

Houve interação entre dieta e tratamento com bixina para a atividade de ALT. A análise dessa interação nos revelou que a associação de bixina á dieta controle elevou a atividade de ALT, enquanto a associação de bixina á dieta hipercolesterolemiante reduziu a atividade desta enzima. Não houve diferença entre os grupos para a atividade de AST.

As dietas hipercolesterolemiantes elevaram a atividade da ALP. Os animais do grupo H (56,34 ± 6,64) apresentaram maiores níveis de atividade dessa enzima, e a adição de bixina à essa dieta fez com que houvesse uma redução dessa atividade nos animais do grupo HBO (37,30 ± 4,70) que foram estatisticamente iguais aos animais do grupo CBO (34,09 ± 2,4).

*Tabela 16 – Atividade das enzimas séricas ALT, AST e ALP de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | ALT (U/I) | AST (U/I) | ALP (U/L) |
|---|---|---|---|
| **C** | 8,49 ± 2,53 [b] | 21,50 ± 3,86 | 23,38 ± 5,63 [c] |
| **CBO** | 12,59 ± 2,60 [a] | 21,93 ± 6,58 | 34,09 ± 2,40 [b] |
| **H** | 11,73 ± 2,45 [a] | 25,14 ± 5,48 | 56,34 ± 6,64 [a] |
| **HBO** | 7,70 ± 1,24 [b] | 23,39 ± 3,98 | 37,30 ± 4,7 [b] |
| | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | >0,05 | >0,05 | <0,05 |
| **Bixina** | >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).*

5.2.4.2) Parâmetros da função renal

A tabela 17 apresenta os valores das concentrações de creatinina e uréia.

As concentrações da creatinina foram influenciadas pela dieta e pelo tratamento. As dietas hipercolesterolemiantes provocaram um aumento na concentração de creatinina, ao passo que o tratamento com a bixina provocou uma redução. Pela análise da interação entre dieta e bixina, pôde se observar que a bixina reduziu as concentrações de creatinina estando associada tanto à dieta controle quanto à dieta hipercolesterolemiante. Os animais do grupo H (71,66 ± 4,24) apresentaram as maiores concentrações de creatinina, seguido dos animais do grupo C (47,92 ± 6,37), sendo os animais dos grupos CBO (25,32 ± 8,01) e HBO (11,16 ± 4,57) aqueles que obtiveram as menores concentrações.

Dieta e bixina também influenciaram a concentração de uréia. A concentração foi maior nos grupos de animais que receberam as dietas controle em comparação aos grupos que receberam dietas hipercolesterolemiantes e também foi maior para os grupos de animais que tiveram a bixina acrescida em suas dietas. A análise da interação da dieta com a bixina revelou que os animais do grupo CBO (11,88 ± 2,85) apresentaram as maiores concentrações de uréia e que os animais dos grupos C (4,25 ± 0,32), H (4,58 ± 0,46) e HBO

(5,93 ± 0,57) foram estatisticamente iguais entre si, apresentando as menores concentrações.

*Tabela 17 – Concentrações séricas de creatinina e uréia de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Creatinina (µmol/L) | Uréia (mmol/L) |
|---|---|---|
| **C** | 47,92 ± 6,37 [b] | 4,25 ± 0,32 [b] |
| **CBO** | 25,32 ± 8,01 [c] | 11,88 ± 2,85 [a] |
| **H** | 71,66 ± 4,24 [a] | 4,58 ± 0,46 [b] |
| **HBO** | 11,16 ± 4,57 [d] | 5,93 ± 0,57 [b] |
| **Valor de P** | | |
| **Dieta** | <0,05 | <0,05 |
| **Bixina** | <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).*

### 5.2.5) Defesas antioxidantes

5.2.5.1) Grupos sulfidrilas

A tabela 18 apresenta os valores das concentrações dos grupos sulfidrilas totais, livres e ligados a proteínas.

A dieta influenciou as concentrações dos grupos sulfidrilas totais e dos grupos sulfidrilas ligados à proteínas e o tratamento influenciou as concentrações dos grupos sulfidrilas livres.

As dietas hipercolesterolemiantes reduziram as concentrações dos grupos sulfidrilas totais e dos grupos sulfidrilas ligados às proteínas. A bixina associada às dietas controle e hipercolesterolemiante elevou as concentrações dos grupos sulfidrilas livres nos animais dos grupos CBO e HBO em 24% e 12% respectivamente.

*Tabela 18 – Concentrações séricas de sulfidrilas totais, livres e ligadas a proteínas de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Sulfidrilas totais (μmol/L) | Sulfidrilas livres (μmol/L) | Sulfidrilas ligadas a proteínas (μmol/L) |
|---|---|---|---|
| **C** | 238,67 ± 23,78 | 102,53 ± 2,43 [b] | 135,92 ± 22,57 |
| **CBO** | 230,16 ± 33,93 | 127,04 ± 8,87 [a] | 103,12 ± 37,30 |
| **H** | 190,84 ± 15,50 | 107,76 ± 5,81 [b] | 83,08 ± 15,93 |
| **HBO** | 215,32 ± 42,49 | 121,25 ± 4,02 [a] | 82,24 ± 42,69 |
| **Valor de P** | | | |
| **Dieta** | <0,05 | >0,05 | <0,05 |
| **Bixina** | >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).*

5.2.5.2) Paraoxonase

A tabela 19 apresenta os valores das atividades arilesterase e paraoxonase da PON.

As dietas hipercolesterolemiantes reduziram atividade arielterase da PON em comparação com as dietas controle e análise da interação da dieta com a bixina revelou que a adição de bixina á dieta hipercolesterolemiante provocou uma elevação desta atividade nos animais do grupo HBO enquanto sua associação à dieta controle levou á uma redução desta atividade para o grupo CBO.

A interação da dieta com a bixina revelou que a atividade paraoxonase da PON foi maior para os animais do grupo C e menor para o grupo H. Assim como para atividade arielesterase, a associação da bixina às dietas controle e hipercolesterolemiante, tiveram efeitos diferenciados. Quando adicionada à dieta hipercolesterolemiante a bixina elevou a atividade paraoxonase da PON e quando adicionada à dieta controle, reduziu esta atividade.

*Tabela 19 – Atividades arilesterase e paraoxonase da PON de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | PON arilesterase U/mL | PON paraoxon U/mL |
|---|---|---|
| **C** | 30,95 ± 3,63 [a] | 0,15 ± 0,03 [a] |
| **CBO** | 18,28 ± 3,27 [c] | 0,09 ± 0,03 [b,c] |
| **H** | 16,49 ± 1,97 [c] | 0,07 ± 0,03 [c] |
| **HBO** | 26,03 ± 3,20 [b] | 0,12 ± 0,02 [a,b] |
| **Valor de P** | | |
| **Dieta** | <0,05 | >0,05 |
| **Bixina** | >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).*

### 5.2.6) Glicose, proteínas totais e albumina

A tabela 20 apresenta as concentrações de glicose, proteínas totais e albumina.

Não houve diferença entre os grupos para o parâmetro glicose. As dietas hipercolesterolemiantes elevaram as concentrações de proteínas quando comparadas às dietas controle.

As dietas hipercolesterolemiantes provocaram um aumento da concentração de albumina se comparadas às dietas controle, ao passo que a suplementação de bixina às dietas provocou uma redução dessas concentrações.

*Tabela 20 – Concentrações séricas de glicose, proteínas totais e albumina de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Glicose (mmol/L) | Proteínas Totais (g/L) | Albumina (μmol/L) |
|---|---|---|---|
| **C** | 5,87 ± 1,40 | 57,80 ± 4,94 | 447,33 ± 25,59 |
| **CBO** | 5,92 ± 1,04 | 52,87 ± 5,54 | 380,47 ± 64,38 |
| **H** | 5,13 ± 2,14 | 59,38 ± 3,32 | 458,17 ± 20,58 |
| **HBO** | 4,78 ± 0,95 | 58,43 ± 3,36 | 435,57 ± 38,15 |
| **Valor de P** | | | |
| **Dieta** | >0,05 | <0,05 | <0,05 |
| **Bixina** | >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).*

## 5.3) RESULTADOS DO EXPERIMENTO 3

### 5.3.1) Avaliação nutricional

A tabela 21 apresenta os valores de massa corporal inicial e após a adaptação às dietas, ingestão total e massa corporal dos animais ao final do experimento.Não houve diferença de peso entre os grupos de animais ao início do experimento.Após o período de adaptação, observou-se que a massa corporal dos animais foi influenciada pela dieta. Os animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes H (214,13 ± 18,21) e HBO (203,9 ± 11,23) apresentaram maiores massas em comparação aos animais que receberam dietas controle C (192,50 ± 14,29) e CBO (187,79 ± 11,98).Dieta e bixina influenciaram os valores de ingestão e massa corporal final. Os animais que receberam as dietas controle e tratamento com bixina ingeriram em média mais alimentos que os animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes e tratamento isento de bixina respectivamente. Animais que receberam as dietas hipercolesterolemiantes e tratamento isento de bixina apresentaram maior massa corporal ao final do experimento em relação aos animais que receberam dietas controle e tratamento com bixina respectivamente.

*Tabela 21: Massa corporal inicial e após 15 dias de adaptação às dietas, ingestão total, ganho de massa total e massa corporal de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Massa Corporal (g) | Massa Corporal após 15 dias (g) | Ingestão Total (g) | Massa Final (g) |
|---|---|---|---|---|
| **C** | 170,94 ± 11,01 | 192,50 ± 14,29 | 475,89 ± 57,99 | 224,23 ± 7,96 |
| **CBO** | 173,13 ± 6,40 | 187,79 ± 11,98 | 577,76 ± 53,91 | 215,10 ± 19,31 |
| **H** | 171,75 ± 11,17 | 214,13 ± 18,21 | 441,32 ± 21,61 | 264,35 ± 5,81 |
| **HBO** | 173,75 ± 6,63 | 203,90 ± 11,23 | 497,72 ± 51,86 | 240,74 ± 6,37 |
| | | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | >0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| **Bixina** | >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).*

### 5.3.2) Peso dos órgãos

5.3.2.1) Pesos total e relativo dos rins e do baço

A tabela 22 apresenta os valores de peso total e peso relativo para os rins e baço.

Não houve diferença entre os grupos para os valores de peso relativo dos rins e do baço.

O tratamento com bixina influenciou o peso total dos rins. Analisando a interação da dieta com a bixina, observamos que os animais do grupo H (1,58 ± 0,07) apresentaram os maiores valores de peso dos rins e foram estatisticamente diferentes dos demais grupos, que apresentaram menores valores de peso deste órgão e foram estatisticamente iguais entre si C (1,36 ± 0,11), CBO (1,30 ± 0,09) e HBO (1,40 ± 0,09).

A dieta e a bixina influenciaram o peso total do baço. Os animais que receberam as dietas hipercolesterolemiantes apresentaram maiores valores de peso total do baço em comparação aos animais que receberam as dietas controle e os animais que receberam tratamento com bixina obtiveram menores valores comparados aos animais que não receberam o tratamento.

*Tabela 22 – Peso total e peso relativo (peso total do órgão / peso do animal x 100) dos rins e do baço de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Rins (g) | Peso relativo dos rins (g) | Baço (g) | Peso relativo do baço (g) |
|---|---|---|---|---|
| **C** | 1,36 ± 0,11 [b] | 0,61 ± 0,03 | 0,44 ± 0,05 | 0,20 ± 0,03 |
| **CBO** | 1,30 ± 0,09 [b] | 0,60 ± 0,05 | 0,44 ± 0,09 | 0,20 ± 0,04 |
| **H** | 1,58 ± 0,07 [a] | 0,60 ± 0,05 | 0,58 ± 0,05 | 0,22 ± 0,02 |
| **HBO** | 1,40 ± 0,09 [b] | 0,58 ± 0,02 | 0,46 ± 0,05 | 0,39 ± 0,56 |
| | | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | <0,05 | >0,05 | <0,05 | >0,05 |
| **Bixina** | <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).*

5.3.2.2) Pesos total e relativo do fígado e da gordura abdominal

A tabela 23 apresenta os valores de peso total e peso relativo para o fígado e gordura abdominal.

O peso total do fígado foi influenciado pela dieta e pela bixina. As dietas hipercolesterolemiantes provocaram aumento do peso total deste órgão em comparação com as dietas controle, e a adição de bixina às dietas, provocou uma redução no peso total do fígado. Este efeito, entretanto, foi limitado, já que esta redução ocorreu apenas quando a bixina foi associada à dieta hipercolesterolemiante, não ocorrendo quando ela foi adicionada à dieta controle, já que os animais do grupo CBO (6,75 ± 0,88) foram estatisticamente iguais aos animais do grupo C (6,54 ± 0,59).

A dieta hipercolesterolemiante influenciou também o peso relativo deste órgão elevando os seus valores nos animais dos grupos H (5,37 ± 0,58) e HBO (4,95 ± 0,37).

A dieta influenciou os valores de peso total e relativo da gordura abdominal. Os animais que receberam as dietas hipercolesterolemiantes apresentaram maiores valores se comparados aos animais que receberam as dietas controle.

*Tabela 23 – Peso total e peso relativo (peso total do órgão / peso do animal x 100) do fígado e da gordura abdominal de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Fígado (g) | Peso relativo do fígado (g) | Gordura abdominal (g) | Peso relativo da gordura abdominal (g) |
|---|---|---|---|---|
| **C** | 6,54 ± 0,59 [c] | 2,91 ± 0,11 [b] | 2,40 ± 0,73 | 1,06 ± 0,25 |
| **CBO** | 6,75 ± 0,88 [c] | 3,11 ± 0,21 [b] | 2,23 ± 0,85 | 1,34 ± 0,24 |
| **H** | 14,16 ± 1,49 [a] | 5,37 ± 0,58 [a] | 3,55 ± 0,77 | 1,01 ± 0,34 |
| **HBO** | 11,86 ± 1,20 [b] | 4,95 ± 0,37 [a] | 3,04 ± 0,71 | 1,25 ± 0,24 |
| | | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| **Bixina** | <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).*

### 5.3.3)Perfil lipídico

5.3.3.1) Perfil lipídico sérico

A tabela 24 apresenta os resultados do perfil lipídico sérico dos animais.

A dieta e a bixina influenciaram os níveis séricos de colesterol total. As dietas hipercolesterolemiantes e o tratamento com a bixina provocaram um aumento do colesterol total em comparação com as dietas controle e tratamentos isentos de bixina. A análise da interação da dieta com a bixina revelou que a adição de bixina à dieta hipercolesterolemiante provocou uma elevação de aproximadamente 37% na concentração sérica do colesterol total dos animais do grupo HBO (8,76 ± 2,45), que obtiveram concentrações maiores que os animas que receberam a dieta hipercolesterolemiante isenta de bixina H (6,38 ± 1,10). A adição de bixina à dieta controle não exerceu este efeito, uma vez que os animais dos grupos C (2,20 ± 0,25) e CBO (2,45 ± 0,24) foram estatisticamente iguais entre si e apresentaram os menores níveis séricos de colesterol total.

A fração HDL foi maior nos grupos de animais que receberam as dietas controle em comparação aos grupos que receberam dietas hipercolesterolemiantes e a adição de bixina à dieta controle provocou uma elevação de 27,5% dos níveis séricos do colesterol HDL dos animais do grupo CBO (1,99 ± 0,18), que obtiveram maiores concentrações se comparados aos animas que receberam a dieta controle isenta de bixina C (1,56 ± 0,21). Entretanto a suplementação de bixina á dieta hipercolesterolemiante não provocou nenhuma alteração nos níveis de HDL, uma vez que os animais dos grupos H (0,30 ± 0,12) e HBO (0,23 ± 0,07) foram estatisticamente iguais entre si e apresentaram os menores níveis dessa lipoproteína.

O colesterol não-HDL, bem como índice aterogênico, seguiram o mesmo padrão estatístico encontrado para o colesterol total. Houve uma elevação de aproximadamente 40% e 75% do colesterol não - HDL e índice aterogênico respectivamente para os animais do grupo HBO.

As dietas controle provocaram um aumento da concentração de triacilgliceróis se comparadas às dietas hipercolesterolemiantes, ao passo que a suplementação de bixina às dietas provocou uma redução da concentração sérica deste parâmetro.

*Tabela 24 – Concentrações séricas do colesterol total, colesterol HDL, colesterol não-HDL (*Cn-HDL*),índice aterogênico e triacilgliceróis de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Colesterol total (mmol/L) | Colesterol HDL (mmol/L) | Cn-HDL (mmol/L) | Índice Aterogênico* | Triacilgliceróis (mmol/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| **C** | 2,20 ± 0,25 [c] | 1,56 ± 0,21 [b] | 0,64 ± 0,23 [c] | 0,43 ± 0,18 [c] | 0,73 ± 0,18 |
| **CBO** | 2,45 ± 0,24 [c] | 1,99 ± 0,18 [a] | 0,46 ± 0,19 [c] | 0,23 ± 0,10 [c] | 0,61 ± 0,19 |
| **H** | 6,38 ± 1,10 [b] | 0,30 ± 0,12 [c] | 6,08 ±1,11[b] | 22,79 ± 8,5 [b] | 0,67 ± 0,11 |
| **HBO** | 8,76 ± 2,45 [a] | 0,23 ± 0,07 [c] | 8,53 ±2,44[a] | 40,06 ± 17,96 [a] | 0,37 ± 0,06 |
| | | | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| **Bixina** | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| **Interação** | <0,05 | <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).*
** Índice aterogênico = (Cn - HDL) x (Colesterol HDL)* $^{-1}$.

5.3.3.2) Perfil lipídico hepático

A Tabela 25 indica os valores da porcentagem de gordura no fígado e as concentrações hepáticas de colesterol total e triacilgliceróis.

As dietas hipercolesterolemiantes elevaram o percentual de gordura hepática e a concentração do colesterol total hepático

Dieta e bixina influenciaram as concentrações hepáticas de triacilgliceróis. A análise da interação entre estes fatores indica que houve uma elevação (maior que duas vezes) na concentração dos triacilgliceróis quando a bixina foi associada à dieta controle, enquanto nenhum efeito foi observado quando ela foi adicionada à dieta hipercolesterolemiante, sendo os grupos H (53,46 ± 8,59) e HBO (52,79 ± 9,17) estatisticamente iguais entre si.

*Tabela 25 – Porcentagem de gordura hepática e concentrações de colesterol total e triacilgliceróis no fígado de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | % de gordura | Colesterol | Triglicérides |
|---|---|---|---|
| **C** | 11,6 ± 1,77 | 4,68 ± 1,04 | 13,11 ± 2,33 [c] |
| **CBO** | 15,79 ± 4,3 | 8,03 ± 1,96 | 28,65 ± 5,49 [b] |
| **H** | 57,92 ± 4,43 | 181,63 ± 11,44 | 53,46 ± 8,59 [a] |
| **HBO** | 59,05 ± 4,08 | 183,99 ± 15,93 | 52,79 ± 9,17 [a] |
| | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| **Bixina** | >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).*

5.3.3.3) Perfil lipídico fecal

A Tabela 26 indica os valores da porcentagem de gordura nas fezes e as concentrações fecais de colesterol total e triacilgliceróis.

As dietas hipercolesterolemiantes e o tratamento com a bixina provocaram aumentos no percentual de gordura e nas concentrações do colesterol total e triacilgliceróis fecais em comparação com as dietas controle e tratamentos isentos de bixina. A análise da interação da dieta com a bixina nos revelou que a adição de bixina à dieta hipercolesterolemiante provocou uma elevação de aproximadamente 18% no percentual da gordura fecal dos animais do grupo HBO (15,36 ± 1,61) em comparação aos animas do grupo H (12,97 ± 0,64) enquanto a sua associação à dieta controle não provocou nenhum efeito visto que os animais dos grupos C e CBO são estatisticamente iguais entre si. Para os triacilgliceróis, o mesmo efeito foi observado, com uma elevação de aproximadamente 74% dos triacilgliceróis dos animais do grupo HBO (29,23 ± 3,22) em comparação aos animas do grupo H (16,73 ± 6,06).

*Tabela 26 – Porcentagem de gordura fecal e concentrações de colesterol total e triacilgliceróis nas fezes de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | % de gordura | Colesterol | Triglicérides |
|---|---|---|---|
| **C** | 2,1 ± 0,26 [c] | 1,56 ± 0,43 | 0,54 ± 0,26 [c] |
| **CBO** | 2,16 ± 0,48 [c] | 2,41 ± 0,6 | 2,73 ± 0,72 [c] |
| **H** | 12,97 ± 0,64 [b] | 61,35 ± 6,44 | 16,73 ± 6,06 [b] |
| **HBO** | 15,36 ± 1,61 [a] | 69,36 ± 7,62 | 29,23 ± 3,22 [a] |
| | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| **Bixina** | <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).*

### 5.3.4) Parâmetros relacionados ao metabolismo hepático e renal

#### 5.3.4.1) Parâmetros da função hepática

A tabela 27 apresenta os valores das atividades da ALT, AST e ALP.

As dietas hipercolesterolemiantes elevaram as atividades das enzimas ALT e AST.

A atividade da fosfatase alcalina foi influenciada pela dieta e pela bixina. Os animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes e tratamento com bixina apresentaram maiores níveis de ALP se comparados aos animais que receberam dietas controle e tratamentos isentos de bixina. A análise da interação da dieta com a bixina revelou que a adição de bixina à dieta hipercolesterolemiante provocou uma elevação na atividade de ALP dos animais do grupo HBO (47,73 ± 7,89), que obtiveram concentrações maiores que os animas que receberam a dieta hipercolesterolemiante isenta de bixina H (30,04 ± 8,19).

*Tabela 27 – Atividade das enzimas séricas ALT, AST e ALP de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | ALT (U/I) | AST (U/I) | ALP (U/L) |
|---|---|---|---|
| **C** | 7,15 ± 2,56 | 19,41 ± 3,97 | 17,18 ± 5,4 [c] |
| **CBO** | 5,73 ± 1,33 | 18,45 ± 2,87 | 24,89 ± 3,18 [b,c] |
| **H** | 10,34 ± 3,28 | 25,71 ± 3,07 | 30,04 ± 8,19 [b] |
| **HBO** | 10,78 ± 2,42 | 29,43 ± 4,07 | 47,73 ± 7,89 [a] |
| | **Valor de P** | | |
| **Dieta** | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| **Bixina** | >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).*

5.3.4.2) Parâmetros da função renal

A tabela 28 apresenta valores das concentrações de creatinina e uréia

Não houve diferença entre os grupos para o parâmetro uréia. As concentrações da creatinina foram influenciadas pela dieta e pelo tratamento. As dietas hipercolesterolemiantes provocaram um aumento na concentração de creatinina, ao passo que o tratamento com a bixina provocou uma redução. A análise da interação entre dieta e bixina revelou que os animais do grupo CBO (31,85 ± 7,09) apresentaram as menores concentrações de creatinina e que os animais dos grupos C (63,61 ± 11,31), H (66,29 ± 19,32) e HBO (59,29 ± 9,12) foram estatisticamente iguais entre si, apresentando as maiores concentrações.

*Tabela 28 – Concentrações séricas de creatinina e uréia de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Creatinina (µmol/L) | Uréia (mmol/L) |
|---|---|---|
| **C** | 63,61 ± 11,31 [a] | 4,89 ± 0,64 |
| **CBO** | 31,85 ± 7,09 [b] | 4,97 ± 0,79 |
| **H** | 66,29 ± 19,32 [a] | 4,60 ± 0,73 |
| **HBO** | 59,29 ± 9,12 [a] | 4,49 ± 0,42 |
| **Valor de P** | | |
| **Dieta** | <0,05 | >0,05 |
| **Bixina** | <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).*

### 5.3.5) Defesas antioxidantes

5.3.5.1) Grupos sulfidrilas

A tabela 29 apresenta os valores das concentrações dos grupos sulfidrilas totais, livres e ligados a proteínas.

O tratamento com bixina elevou as concentrações dos grupos sulfidrilas totais, dos grupos sulfidrilas livres e dos grupos sulfidrilas ligados à proteínas.

Os animais que receberam tratamento com a bixina apresentaram os maiores níveis de sulfidrilas totais (CBO: 549,5 ± 47,63; HBO: 527,71 ± 45,37) e sulfidrilas ligadas a proteínas (CBO: 459,35 ± 49,78; HBO: 445,17 ± 48,21).

A análise da interação entre dieta e bixina para os grupos sulfidrilas livres nos revelou que adição de bixina à dieta controle elevou a concentração dos grupos sulfidrilas livres nos animais do grupo CBO (90,15 ± 9,11) em 14% se comparado aos animais do grupo C (64,89 ± 5,91), que não receberam o tratamento com o carotenóide e apresentaram as menores concentrações de sulfidrilas livres. Os animais do grupo CBO foram estatisticamente semelhantes aos animais do grupo HBO (82,54 ± 8,25) e os animais do

grupo H (72,95 ± 7,57) foram estatisticamente semelhantes aos animais dos grupos HBO e C.

*Tabela 29 - Concentrações séricas de sulfidrilas totais, livres e ligadas a proteínas de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Sulfidrilas totais (μmol/L) | Sulfidrilas livres (μmol/L) | Sulfidrilas ligadas à proteínas (μmol/L) |
|---|---|---|---|
| **C** | 309,55 ± 35,95 | 64,89 ± 5,91 [c] | 244,66 ± 36,51 |
| **CBO** | 549,50 ± 47,63 | 90,15 ± 9,11 [a] | 459,35 ± 49,78 |
| **H** | 295,96 ± 28,59 | 72,95 ± 7,57 [b,c] | 223,00 ± 30,54 |
| **HBO** | 527,71 ± 45,37 | 82,54 ± 8,25 [a,b] | 445,17 ± 48,21 |
| **Valor de P** | | | |
| **Dieta** | >0,05 | >0,05 | >0,05 |
| **Bixina** | <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).*

5.3.5.2) Paraoxonase

A tabela 30 apresenta os valores das atividades arilesterase e paraoxonase da PON.

Dieta e bixina influenciaram a atividade arielterase da PON. As dietas hipercolesterolemiantes reduziram essa atividade em comparação com as dietas controle e a suplementação da bixina às dietas elevou essa atividade em comparação com a não suplementação.

A interação da dieta com a bixina para a atividade arilesterase da PON, revelou que a adição de bixina à dieta controle provocou uma elevação de 60,34% dessa atividade nos animais do grupo CBO (59,60 ± 6,57), se comparados aos animas que receberam a dieta controle isenta de bixina C (37,10 ± 7,60). Entretanto a suplementação de bixina á dieta hipercolesterolemiante não provocou nenhuma alteração na atividade arilesterase da PON, uma vez que os animais dos grupos H (16,7 0 ± 3,24) e HBO (23,24 ± 4,47) foram estatisticamente iguais entre si.

Dieta e bixina influenciaram a atividade paraoxonase da PON. As dietas hipercolesterolemiantes e a suplementação da bixina às dietas reduziram essa atividade em comparação com as dietas controle e a não suplementação.

A interação da dieta com a bixina para a atividade paraoxonase da PON, revelou que os animais que receberam dietas controle, suplementados ou não com bixina, foram estatisticamente iguais entre si C (0,29 ± 0,01) e CBO (0,30 ± 0,03) e apresentaram os maiores valores de atividade paraoxonase da PON. Enquanto a adição de bixina à dieta hipercolesterolemiante provocou uma redução de aproximadamente 34% dessa atividade nos animais do grupo HBO (0,10 ± 0,03), se comparados aos animas que receberam a dieta hipercolesterolemiante isenta de bixina H (0,15 ± 0,02).

*Tabela 30 - Atividades de arilesterasee e paraoxonase da PON de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | PON arilesterase U/mL | PON paraoxon U/mL |
|---|---|---|
| **C** | 37,10 ± 7,6 [b] | 0,29 ± 0,01 [a] |
| **CBO** | 59,60 ± 6,57 [a] | 0,30 ± 0,03 [a] |
| **H** | 16,7 0 ± 3,24 [c] | 0,15 ± 0,02 [b] |
| **HBO** | 23,24 ± 4,47 [c] | 0,10 ± 0,03 [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).*

### 5.3.6) Glicose, proteínas totais e albumina

A tabela 31 apresenta as concentrações de glicose, proteínas totais e albumina.

A dieta hipercolesterolemiante elevou a glicemia dos animais e a adição de bixina elevou a concentração de albumina.

A concentração das proteínas totais foi influenciada pela dieta e pela bixina. Os animais que receberam as dietas hipercolesterolemiantes e os animais que receberam tratamentos isentos de bixina apresentaram maiores concentrações de proteínas quando comparados aos animais que receberam dietas controle e tratamento com a bixina.

*Tabela 31 – Concentrações séricas de glicose, proteínas totais e albumina de animais alimentados com dieta padrão (C), dieta padrão + extrato oleoso de bixina (CBO), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemiante + extrato oleoso de bixina (HBO).*

| Grupos | Glicose (mmol/L) | Proteínas Totais (g/L) | Albumina (μmol/L) |
|---|---|---|---|
| **C** | 7,60 ± 0,47 | 69,80 ± 3,76 | 310,83 ± 35,55 |
| **CBO** | 7,27 ± 0,86 | 62,12 ± 4,06 | 435,62 ± 54,87 |
| **H** | 8,40 ± 1,03 | 82,96 ± 7,57 | 345,36 ± 25,92 |
| **HBO** | 7,87 ± 0,92 | 75,79 ± 4,69 | 416,37 ± 37,96 |
| **Valor de P** | | | |
| **Dieta** | <0,05 | <0,05 | >0,05 |
| **Bixina** | >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).*

O resumo dos resultados de todos os experimentos encontra-se no anexo III.

# DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

# CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO

## EXPERIMENTO 1

**Peso após quinze dias de adaptação às dietas, ingestão total, peso corporal final e peso de gordura abdominal.**

Após 15 dias de adaptação as dietas, os animais que receberam as dietas controle apresentaram os maiores valores de massa corporal, e ao final do experimento eles obtiveram maiores valores de massa corporal e gordura abdominal. (Tab. 2 e 3).

Os animais que receberam dietas contendo extrato oleoso de bixina tiveram menores valores de ingestão alimentar e menores valores de massa corporal ao fim do experimento. Possivelmente a quantidade de extrato adicionada às dietas desagradava o paladar dos animais, fazendo com que eles se alimentassem menos. Outra explicação pode ser baseada no conteúdo energético dessas dietas, que possuíam maior valor calórico, o que levaria a menor ingestão pelos animais, uma vez que eles se alimentam com base no valor energético da dieta. (Valor energético: C = 4104 Kcal; CBO = 4197,75 Kcal; H= 4434 Kcal e HBO = 4577,75 Kcal).

Menaker e Navia (1973), ofereceram a ratas (não-grávidas e desmamadas) dois tipos de dietas isocalóricas que variavam apenas no conteúdo protéico (8% e 25%) e observaram que, durante o crescimento, o controle do apetite parecia ser regulado de tal maneira que a ingestão alimentar foi similar tanto para os animais que consumiram dieta com alto conteúdo protéico quanto para os animais que consumiram dieta com baixo conteúdo protéico, concluindo que a energia é o principal regulador do apetite.

Além disso, Matos et al., (2005) testando modelos diferentes de dietas hipercolesterolemiantes, observaram que a dieta mais calórica foi a menos ingerida pelos animais, constatando o fato de que quanto maior o valor energético, menor a ingestão.

**Perfil lipídico**

Investigações anatomopatológicas, epidemiológicas, clinicas e terapêuticas demonstraram suficiente e exaustivamente a vinculação entre hipercolesterolemia e doenças arteriais coronarianas. Por outro lado, a redução dos níveis plasmáticos de colesterol total e particularmente, da fração LDL, quer através de modificações no estilo de vida, quer através de medicamentos, têm se mostrado eficaz para a diminuição de eventos coronarianos, normalização da função endotelial, estabilização e até mesmo, regressão de lesões ateroscleróticas. Como resultado, tentativas para diminuir esta doença são de extrema importância, e a redução na sua ocorrência e progressão continuam sendo importantes metas na medicina preventiva. (Gonçalves et al., 2006).

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). Há investigações de pesquisadores empregando extratos de plantas contendo flavonóides e utilizando em modelos animais em que foram induzidas doenças cardiovasculares (Lima et al,. 2001).

Componentes bioativos como os flavonóides e os carotenóides encontrados em plantas possuem diversas ações benéficas, dentre elas a ação antioxidante, que está relacionada à proteção do organismo contra os radicais livres, os quais estão envolvidos na instalação de várias doenças degenerativas, como aterosclerose e desordens cardiovasculares.

Os flavonóides 7-glicosil-apigenina, 7-bissulfato-apigenina, 7-glicosil-luteolina, 7-bissulfato-luteolina e os corantes bixina e norbixina foram isoladas das sementes de urucum e tiveram suas estruturas identificadas (Lima et al., 2001).

Muitos estudos têm sido conduzidos com flavonóides, e as flavonas, tais como a quercetina e luteolina, têm mostrado efeitos como antioxidantes na prevenção de câncer e também como inibidores na formação de placas ateroscleróticas. Cai et al.,(1999) demonstraram os efeitos da quercetina e luteolina na remoção dos radicais superóxidos, na

inibição da formação de radicais livres, principalmente $O_2$ e na inibição da oxidação lipídica induzida por $FeCl_2$ no fígado de ratos.

Estudos com apigenina mostraram várias atividades biológicas para este flavonóide. Varma, (1686), cita o efeito inibidor da apigenina na concentração de $10^{-4}$ M sobre a aldose redutase (98% de inibição), enzima que converte açúcares em alcoóis e cuja atividade pode estar eventualmente relacionada com a formação de cataratas em indivíduos diabéticos. Outros pesquisadores testaram a ação antiinflamatória da dimetil-éter apigenina, mostrando que este composto apresentou na dose de 75 mg/kg de peso uma percentagem de inibição em processos inflamatórios. Estas atividades, associadas ao efeito hipolipidêmico destes compostos, são importantes, uma vez que no processo de aterosclerose ocorrem inflamações e depósito de colesterol nas artérias, levando ao infarto do miocárdio (Lima et al., 2001).

A ação antioxidante dos carotenóides, entre os quais se incluem a bixina e a norbixina, seria a proteção do endotélio contra os danos da LDL oxidada, uma vez que as lesões ateroscleróticas iniciam-se após algum tipo de injúria ao endotélio, normalmente causada pela oxidação dessa lipoproteína. Os carotenóides são captados neste processo impedindo esta oxidação já que possuem duplas ligações conjugadas em sua estrutura, que atuam como antioxidantes (Fontana et al., 2000).

Com relação às dietas oferecidas e ao tratamento utilizado, obtivemos resultados bastantes interessantes relacionados ao perfil lipídico dos animais. Pela análise dos nossos dados (Tab. 5), podemos observar que a dieta hipercolesterolemiante demonstrou-se eficiente, uma vez que elevou as concentrações de colesterol total e colesterol não HDL e promoveu uma redução da concentração de colesterol HDL em relação aos animais que receberam dietas controle.

Dietas hipercolesterolemiantes têm o poder de aumentar os níveis de colesterol em ratos (Matos, 2002) e, além disso, dietas com altas taxas de gordura normalmente significam aumento na quantia ingerida de gordura saturada, que aumenta a concentração de colesterol LDL na corrente sanguínea (German e Dillard, 2004).

O tratamento com bixina oleosa associada à dieta hipercolesterolemiante foi responsável por uma redução significativa dos níveis de colesterol total e colesterol não-HDL nos animais do grupo HBO em relação aos animais do grupo H (redução de aproximadamente 41% e 46% respectivamente). Apesar de não haver diferenças significativas para os níveis de HDL entre os animais dos grupos H e HBO, a redução dos níveis de colesterol não HDL nos animais do grupo HBO foi responsável por uma redução de aproximadamente 54% do índice aterogênico neste grupo.

Quando associada à dieta controle, a bixina foi responsável por um aumento de 45% nos níveis de HDL para os animais do grupo CBO. Além disso, o tratamento com bixina foi responsável pela redução dos níveis séricos de triacilgliceróis nos animais dos grupos CBO e HBO (Tab. 5).

Estes dados considerados conjuntamente indicam uma melhora no perfil lipídico sérico nos animais tratados com bixina, indicando que ela isoladamente e/ou associada aos flavonóides presentes no urucum possam estar afetando o metabolismo lipídico tanto dos animais que receberam dieta controle quanto aqueles que receberam dieta hipercolesterolemiante, o que corrobora com dados da literatura.

Lima et al ., (2001) observaram em coelhos, que a administração de bixina por via oral, na dose de 0,01 mol/kg de peso corporal, foi responsável por uma redução do colesterol total (-44,03%) e consideram que uma redução de 44,03% nos níveis de colesterol é comparável a resultados que se obtêm com medicamentos. Adicionalmente, atribuíram que esta ação da bixina ocorreu possivelmente pelo fato de ela estar misturada com flavonóides (luteolina e apigenina). Em nosso experimento a redução do colesterol total também foi bastante expressiva (-41%) e não podemos descartar a possibilidade de que flavonóides presentes no extrato de urucum estejam exercendo influência sobre esta redução.

A abordagem do nosso trabalho não nos permite propor mecanismos, mas através de dados da literatura tentaremos sugerir como a bixina atuou na redução do colesterol total e nas frações aterogênicas (VLDL e LDL).

A regulação da concentração plasmática do colesterol envolve fatores que influenciam tanto o metabolismo do colesterol intracelular como o extracelular. Para a manutenção dos níveis de colesterol são acionados mecanismos distintos que podem controlar a quantidade e atividade da HMG-CoA redutase (3-Hidróxi-3metil-glutaril CoA redutase), a endocitose mediada por receptores, o excesso intracelular de colesterol livre (através da colesterol aciltransferase - ACAT) e o transporte reverso mediado por HDL. Esses mecanismos exibem alto grau de complexidade e agindo sinergicamente concorrem para manter o pool de colesterol no organismo constante.

A biossíntese do colesterol ocorre principalmente no fígado, onde a enzima HMG-CoA redutase é a enzima limitante no processo de síntese endógena e tem sua atividade 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).

Níveis elevados de colesterol por si só, limitam a síntese endógena do colesterol, por mecanismos de feed-bak que regulam a atividade da HMG-CoA redutase e, além disso, já foi comprovado em estudos com hamsteres que dietas hipercolesterolemiantes provocam uma redução na expressão do gene da HMG-CoA redutase (Beynen et al., 1987; Lopes e Ness, 1997). Possivelmente estes fatores (regulação e redução de expressão da HMG-CoA redutase) também podem estar ocorrendo com o nosso modelo animal, fazendo com que a síntese endógena seja reduzida e sendo o colesterol exógeno (fornecida pela dieta) o responsável pelo quadro de hipercolesterolemia desenvolvido em nossos animais.

Com exceção dos tecidos esteroidogênicos e do fígado, as células não podem transformar o colesterol. Ao invés disso, elas modulam o colesterol contido em suas membranas por um sistema de feedback que controla a taxa de biossíntese e absorção de colesterol através dos receptores de LDL (LDLR) (Oram, 2002) .

Quando o nível de colesterol nas células esta baixo, precursores de proteínas ligadoras de elementos de resposta a esteróis (SREBPs) são transferidos do retículo endoplasmático para o Golgi. Seguindo um evento de clivagem, SREBPs são liberados da membrana do Golgi e translocados para o núcleo, onde ele ativa a transcrição de mais de

trinta genes envolvidos na síntese de colesterol e lipídios, incluindo o receptor de LDL e a HMG-CoA redutase. ( Redinger, 2003; Gent e Braakman, 2004; Weber et al., 2004) .

Através desses mecanismos, o colesterol é produzido e os receptores de LDL promovem uma maior entrada de colesterol via LDL. Quando os níveis de colesterol intracelular estão elevados, o transporte de SREBP do retículo endoplasmático é inibido e não há síntese de colesterol e nem de receptores de LDL. (Gent e Braakman, 2004; Weber et al., 2004). Dietas hipercolesterolemiantes então interromperiam a síntese de colesterol bem como a transcrição de receptores para LDL, resultando em altos níveis colesterol plasmático.

Em nosso experimento, verificamos que a bixina diminuiu o colesterol total e o colesterol não-HDL (correspondente às frações aterogênicas) no grupo HBO, além de reduzir o índice aterogênico dos animais do grupo HBO. Como será que a bixina agiu em relação às frações aterogênicas? A transcrição do receptor de LDL poderia não estar interrompida mesmo com a administração de uma dieta hipercolesterolemiante? E as enzimas envolvidas na homeostase do colesterol, sofreriam alguma ação da bixina?

Parece que há mecanismos mais complexos de regulação das SREBPs e conseqüentemente das enzimas envolvidas na síntese de colesterol e de receptores hepáticos de LDL.

Estudando a captação de LDL em animais com altas (ratos), baixas (hamsteres fêmeas) e muito baixas (hamsteres machos) taxas basais de síntese hepática de esterol, Spady et al (1985), sugerem que a taxa de síntese de colesterol hepático e de receptor de LDL são reguladas independentemente.

Grand-Perret et al., (2001) verificaram em hamsteres e em células de hepatoma humano, uma maior expressão e atividade do receptor de LDL, mesmo na presença de excesso de esteróis.

É possível que em camundongos, a atividade do receptor de LDL hepático, seja menos suscetível a regulação que em humanos (van Vlijmen et al, 1996). Isto é suportado por Tang et al., (1991) e Dueland et al. (1993), que observaram que camundongos C57BL/6J alimentados com uma dieta rica em gordura e colesterol, tiveram uma “down

regulation" na atividade da HMG-CoA A redutase, enquanto a expressão do receptor de LDL não foi relativamente alterada.

Embora a abordagem deste trabalho não nos permita propor mecanismos pelos quais a bixina contribua para a redução do colesterol, podemos supor que o tratamento com a bixina possa estar estimulando fatores transcricionais envolvidos na síntese de receptores de LDL nos animais alimentados com a dieta hipercolesterolemiante, pois a redução nos níveis de colesterol total e colesterol não HDL que observamos nos animais tratados com a bixina sugerem uma maior captação e uma possível ação da bixina sob os receptores de LDL. E isto poderia em parte explicar a redução do colesterol total observada em nossos animais, que mesmo mantidos com dietas hipercolesterolemiantes poderiam continuar expressando os receptores de LDL e promover a sua captação.

Uma vez captado e internalizado no fígado, enzimas denominadas citocromo P450 (P450s) conhecidas como CYP 7 α 1, 27 α 1, 11 α 1, e 46 α 1 catalisam os primeiros passos em diferentes vias do metabolismo do colesterol (Pikuleva, 2006).

A estrutura em anel do colesterol não pode ser metabolizada a $CO_2$ e $H_2O$ 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).

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, microssomos, mitocôndrias e peroxisomos, sendo a enzima microssomal chave e limitante da velocidade de reação, a 7-

α-hidroxilase (CYP7α 1) (Chiang, 2004) , a qual é expressa 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).

Dois receptores nucleares, o receptor X hepático (RXL) e o receptor X farnesóide (RXF), tem sido implicados na regulação transcricional por *feed-back* da atividade da CYP7A1 (Gupta et al., 2002).

O RXL, 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 a ácidos biliares, durante uma série de eventos, por regulação positiva da enzima 7α-hidroxilase, diminuindo assim os níveis de colesterol intracelular. (Wolters et al., 2002; Redinger, 2003) .

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 (Wolters et al., 2002; Redinger, 2003).

Estudos têm mostrado que a regulação da CYP7α 1 através do colesterol dietético parece variar de acordo com a espécie (Chiang, 1998). Sendo que em algumas espécies o colesterol dietético induz uma "*up regulation*" na expressão do gene da CYP7α 1 (Repa e Mangelsdorf, 2000). O colesterol dietético induz a expressão da CYP7α 1 em ratos (Horton et al,. 1995) e camundongos (Goodwin et al., 2003) e em contraste apresenta pequeno efeito, ou até mesmo em alguns casos, suprime a expressão de CYP7α 1 em outras espécies, tais como hamsteres (Horton et al., 1995) e coelhos (Xu et al., 1995).

Muitos trabalhos têm demonstrado a ação hipocolesterolemiante do carotenóide curcumina. Rao et al., (1970), descreveram que 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. Um aumento na atividade da enzima colesterol-7-α-hidroxilase, ocorre em ratos alimentados com curcumina, sendo esta uma enzima chave na conversão de colesterol a ácidos biliares (Suresh Babu e Srinivasan, 1997).

Pouco se sabe a respeito da ação da bixina sobre a colesterol-7-α-hidroxilase, sendo assim, a porcentagem de gordura hepática e fecal nos daria um indício se o colesterol estaria sendo mais eficientemente convertido à ácidos biliares ou se ele estaria sendo eliminado nas fezes. O que observamos foi que uma menor porcentagem de gordura hepática e fecal foi encontrada nos animais do grupo HBO em relação ao grupo H (redução de aproximadamente 21% e 32% respectivamente) sugerindo que esteja havendo uma maior conversão de colesterol à ácidos biliares no fígado, possivelmente por aumento da atividade da colesterol-7-α-hidroxilase, o que reduziria o pool de gordura hepática e acarretaria em eliminação de uma menor quantidade de gordura fecal (Tabela 6).

Além disso, o efeito da diminuição do colesterol pode ser explicado pelo fato de os carotenóides poderem 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 sangüínea e o leva ao fígado para que possa ser metabolizado. Este aumento em nosso experimento foi obtido pelos animais do grupo CBO, mas não refletiu em redução do colesterol total quando comparado ao grupo controle.

Um estudo realizado sobre os efeitos de diversos corantes inclusive a cúrcuma, que é um carotenóide, sobre a concentração de colesterol e triacilgliceróis, demonstrou que a cúrcuma reduziu a concentração sérica de triacilgliceróis (Souza, 2001) . Segundo Hasmeda e Polya (1995) , a cúrcuma estimula a conversão de AMP a AMPc. O AMPc atua estimulando a proteína quinase, que por sua vez, ativa a lipase pancreática, que age hidrolisando os triacilgliceróis. Como a bixina é um corante como a cúrcuma, podemos supor um efeito semelhante à esse.

Em um estudo realizado com a finalidade de testar em coelhos hiperlipidêmicos, os efeitos dos flavonóides luteolina e apigenina e dos carotenóides bixina e norbixina extraídos do urucum, foi constatado que as substâncias testadas aumentaram a atividade da lipase em determinadas concentrações. Os modificadores que induziram a atividade lipase foram conferidos à bixina e estes resultados parecem comprovar uma explicação para os efeitos hipotrigliceridêmicos destas duas classes de substâncias (Lima, 2001).

Pesquisas 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 o colesterol HDL em 16,14% e diminuiu os triacilgliceróis em 63,33%.

Estudos de mecanismos de ação realizados mostraram que os flavonóides são capazes de aumentar a atividade da lipase pancreática. Pereira et al.,(1999), utilizando o flavonóide biochanina A isoladamente e associado ao corante natural monascus, verificaram que tanto o flavonóide quanto o corante apresentaram bons efeitos como hipolipidêmicos, mas neste experimento a associação de biochanina A com monascus reduziu os níveis de triacilgliceróis em 70,89%15.

Levando-se em conta que cada flavonóide e cada corante natural têm um efeito biológico, dependendo de sua estrutura, da variação de doses, da via fornecida (intraperitoneal, intracutânea, intravenosa, oral, cápsula, comprimido, intubação gástrica), estes resultados poderão ser bastante variáveis. Medicamentos, tais como clofibrato, benzafibrato, gemfibrozil e outros são utilizados para provocar a redução destes lipídeos,

mas muitos apresentam diversos efeitos colaterais e a pesquisa de novos fármacos torna-se necessária a todo momento (Lima et al., 2001).

**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 e dessa forma é o órgão central no metabolismo de vários outros carotenóides. Assim achamos importante avaliar através de parâmetros bioquímicos séricos, a função hepática.

O fígado e um órgão grande e complexo, que é bem concebido para o seu papel central no metabolismo carboidratos, proteínas e lipídios. É o local onde os detritos produzidos são detoxificados através de processos, como por exemplo, a desaminação de aminoácidos produzindo uréia. Em conjunto com o baço, está envolvido na destruição de células vermelhas gastas e na recuperação de seus constituintes. É responsável pela síntese e secreção de ácidos biliares, síntese de lipoproteínas e síntese de proteínas plasmáticas. É responsável por manter os níveis glicêmicos estáveis, através da captação e estoque de glicose como glicogênio e quebrá-lo a glicose novamente quando necessário e também por formar glicose a partir de fontes não-glicídicas como aminoácidos. As alterações hepáticas mais comuns nos níveis enzimáticos podem ser divididas em dois grupos principais: aquelas de predominância hepatocelular e as de predominância colestática. No primeiro grupo encontram-se as enzimas AST e ALT e no segundo grupo a ALP (Giannini et al., 2005).

Injúria no fígado se aguda ou crônica, eventualmente resulta em um aumento nas concentrações séricas das aminotransferases. AST e ALT são enzimas que catalisam a transferência de grupos $\alpha$-aminos de aspartato e alanina para grupos $\alpha$-cetos de ácido glutárico para gerar ácido oxalacético e ácido pirúvico respectivamente, os quais são importantes contribuidores do ciclo do acido cítrico. Ambas aminotransferases são altamente concentradas no fígado. AST é também difusamente representada no coração, músculo esquelético, rins e células vermelhas sanguíneas, e ALT tem baixas concentrações

no músculo esquelético e rins, um aumento nos níveis séricos é assim, mais específico para dano hepático. No fígado, ALT está localizada unicamente no citoplasma, enquanto AST é tanto citosólica (20% da atividade total) quanto mitocondrial (80% da atividade total).

Fosfatase alcalina é uma enzima que transporta metabólitos ao longo de membranas celulares. Doenças hepáticas e de ossos são as causas mais comuns de elevação patológica dos níveis de ALP, apesar de ALP poder ser originada de outros tecidos como placenta, rins, intestino ou leucócitos (Fishman, 1990) . O terceiro trimestre de gravidez (origem placentária) e adolescência (origem óssea) estão associadas com um aumento isolado nos níveis séricos de ALP (Dufour et al., 2000). ALP hepático está presente na superfície do epitélio do duto biliar e é um marcador sensível de colestase. Colestase aumenta a síntese e a liberação de ALP e o acúmulo de sais biliares aumenta sua liberação da superfície celular (Moss,1997). O tempo de meia-vida dessa enzima na circulação sanguínea é de aproximadamente uma semana. Isto explicaria o motivo da ALP aumentar tardiamente na obstrução do duto biliar e diminuir lentamente após a resolução do problema (Giannini et al., 2005). Injúria hepática induzida por drogas pode apresentar-se com um perfil colestático (preferencialmente com um aumento de ALP ou da razão ALT/ALP < 2), embora o grau de alteração da ALP seja variável e pode estar acompanhado por um quadro de hiperbilirrubinemia (Velayudham e Farrell, 2003). Drogas comumente usadas como anti-hipertensivas ou hormônios podem causar colestase e potencializar a liberação de ALP para a corrente sanguínea. Níveis anormais de ALP também podem ser sinais de câncer metastático do fígado, linfoma ou doenças infiltrativas do fígado. Nestas situações os níveis de ALP podem estar marcadamente elevados e ser o único sinal do envolvimento hepático (Giannini et al., 2005) .

Verificamos o peso total e relativo do fígado, bem como as atividades da ALT, AST e ALP para observamos se as alterações no metabolismo de lipídeos estariam provocando alguma injúria neste órgão. O que observamos foi um aumento do peso total e relativo deste órgão (Tab. 4) nos animais hipercolesterolêmicos o que corrobora com dados obtidos por Story et al. (1981) e Rosa et al., (1998). Além disso, ao observarmos

macroscopicamente os fígados, estes se apresentavam maiores e com coloração mais clara que a dos animais dos grupos controle.

Nossos resultados indicaram uma redução da atividade da ALT quando a bixina foi adicionada à dieta hipercolesterolemiante e uma redução da AST quando a bixina foi adicionada tanto à dieta controle quanto à dieta hipercolesterolemiante (Tab. 7).

Zamora et al., (1991), mostraram que a administração de β-caroteno (30 mg/Kg de dieta) foi efetiva em prevenir danos hepáticos com uma concomitante redução de atividade de AST em ratos.

Lima et al., (2003) em sua avaliação da ação terapêutica da quercetina, bixina e norbixina, em coelhos hiperlipidêmicos observaram que o tratamento de bixina em associação com quercetina promoveu uma maior redução da atividade de AST e que o tratamento isolado com bixina foi o responsável pela maior redução da atividade de ALT.

De Paula et al., (2005), trataram ratos machos *Fisher* com infusão aquosa de urucum, e observaram que os animais que receberam dieta hipercolesterolemiante mais a infusão apresentaram valores da atividade da AST e ALT estatisticamente semelhantes aos animais do grupo controle.

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 foi observada 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 diferença significativa em relação ao controle em nenhum dos tratamentos utilizados.

A fosfatase alcalina em nosso experimento tem a especificidade em medir a função hepática; os animais que receberam a dietas hipercolesterolemiantes e os animais que receberam dietas suplementadas com o extrato oleoso de bixina apresentaram valores mais altos da atividade dessa enzima.

O aumento na atividade da ALP em animais que receberam diferentes tipos de óleos é também atribuído à administração de gordura extra na dieta. Aumentos similares na atividade da ALP têm sido mostrados com dietas hiperlipídicas (óleo de canola, óleo de milho, bem como óleos contendo ácidos graxos poliinsaturados). (Hempenius et al., 1997; Kroes et al., 2003; Lina et al., 2006). Os nossos resultados então se confirmam com os dados obtidos da literatura, uma vez que os animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes apresentaram elevações da atividade de ALP. Além disso, verificamos um aumento da ALP também para os animais tratados com a bixina, o que corrobora com dados obtidos por De Paula et al., 2005 e Rossoni Jr et al., 2005.

Se consideramos que o colesterol dietético em ratos induz a expressão da CYP7α 1 e que a bixina aumenta a atividade dessa enzima de maneira semelhante à curcumina (discutida anteriormente), possivelmente uma maior produção e acúmulo de sais biliares pode estar ocorrendo no metabolismo dos nossos animais e este esse maior aporte de ácidos biliares possivelmente estaria ficando retido no fígado e conseqüentemente promovendo elevações de ALP, justificando assim o aumento da atividade desta enzima nos animais dos grupos CBO e HBO.

**Função renal**

A regulação dos líquidos e eletrólitos e a eliminação dos resíduos metabólicos são essenciais a 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 nem a adieta nem a bixina afetaram o peso total e relativo dos rins (Tab. 3) e que o tratamento com a bixina foi responsável pela redução dos níveis séricos de uréia (Tab. 7).

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). Tem sua concentração afetada pela dieta e pelo estado de nutrição e de hidratação, constituindo uma indicação grosseira do estado da função renal. Valores aumentados da uréia plasmática são classificados como: causa pré-renal resultante de defeitos de excreção e causa renal como conseqüência da doença renal aguda ou crônica com diminuição da filtração glomerular. Causas pós-renais, geralmente resultantes de uma obstrução do trato urinário, podem ocorrer nas litíases renais e nos tumores por compressão da bexiga (Analisa, 1999). Os menores níveis séricos da uréia resultam de uma menor ingestão de proteínas, redução da taxa de catabolismo muscular e reutilização da uréia na síntese de compostos como aminoácidos não-essenciais (Vannucchi e Marchini, 2007).

Em nossos experimentos observamos uma redução dos níveis de uréia para os animais dos grupos CBO e HBO. Os animais destes grupos apresentaram menores valores de ingestão ao longo do experimento, o que pode ter levado a uma menor ingestão de proteínas e possivelmente a uma redução sérica da uréia. De fato, os níveis de proteínas totais séricas nos animais do grupo HBO se encontram reduzidos, e os níveis do grupo CBO tenderam à uma redução se comparados aos animais dos grupos H e C respectivamente.

Reduções séricas de uréia também foram obtidas por Lima et al., (2003). A bixina isoladamente reduziu em 30,83% os níveis de uréia em relação aos animais tratados com ração, e a sua associação à quercetina reduziu os níveis de uréia em 33,99%.

**Defesas antioxidantes**

É grande o número de doenças em que se sugere o envolvimento dos radicais livres ou das espécies reativas de oxigênio (ROS). Questiona-se, na maioria dos casos, se estas espécies representam a causa ou meramente a conseqüência destas doenças. Radicais livres e ROS podem contribuir para o aparecimento de doenças ou estar 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 (Halliwell e Gutteridge, 1986; Niki, 2004).

As ROS e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) 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 um grupo metileno ($-CH_2-$) 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 dupla ligação na cadeia carbônica do ácido graxo enfraquece a ligação do átomo de hidrogênio ligado ao carbono adjacente, especialmente se houver dupla ligação de um ou de ambos os lados do $–CH_2-$. O OH• pode iniciar, com muita facilidade, a cascata de lipoperoxidação (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Fisiologicamente, a defesa contra o dano provocado por ROS/RNS é realizada 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).

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). Há varias evidencias da ação de carotenóides atenuando efeitos causados pelo estresse oxidativo (Kritchevsky, 1999; Stephens et al. 1996; Kritchevsky et al., 1995; Hertog et al., 1993; Muzandu et al., 2006; Kaliora et al., 2005).

Os radicais sulfidrilas representam todos os grupos tiois encontrados na glutationa (L-g-glutamil-L-cisteinil-glicina), em proteínas e em compostos de baixo peso molecular no plasma. Os tiois podem ser oxidados quando o estresse oxidativo está elevado, tendo assim os seus níveis no plasma diminuídos (Wisdom et al. 1991).

Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG (glutationa oxidada) e depleção de GSH (glutationa reduzida). 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 estressee oxidativo (Halliwell, 1993). Assim, a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH.

A glutationa reduzida está presente na maioria das células e é o 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. A glutationa é sintetizada a partir do glutamato, cisteína e glicina. A GSH pode ser parcialmente absorvida no intestino e pode ser sintetizada *de novo*, então a GSH é um antioxidante endógeno e exógeno. A glutationa

reduzida destrói eficientemente as ROS direta ou indiretamente através de reações enzimáticas (Fang et al., 2002).

A albumina e a principal fonte de grupos tiois do plasma e é quantitativamente o mais importante componente extracelular de defesa antioxidante. Outras fontes de grupos tiois apresentam baixo peso molecular constituindo as sulfidrilas livres que são representadas por compostos como a cisteína, homocisteína e cistenil-glicina (Kleinman et al., 2000).

Em nosso experimento dosamos as concentrações dos grupos sulfidrilas livres, dos grupos sulfidrilas ligados a proteínas e dos grupos sulfidrilas totais (Tab. 8).

Nos animais que receberam dietas controle houve menos reações entre peróxidos de hidrogênio e/ou hidroperóxidos lipídicos e as sulfidrilas e conseqüentemente formaram-se menos pontes de dissulfeto entre sulfidrilas quando comparadas à dieta hipercolesterolêmica, já que a dieta controle possui menos lipídios. Devido a isso maiores concentrações de grupos sulfidrilas totais e ligados a proteínas sob a forma reduzida (GSH) foram obtidos.

Os animais que receberam tratamento com bixina apresentaram valores maiores de sulfidrilas livres (aumento de quase 4 vezes nos animais do grupo CBO em relação ao grupo C e aumento de quase 2,5 vezes para os animais do grupo HBO em relação ao grupo H) e conseqüentemente de sulfidrilas totais, além de apresentarem uma tendência a elevar também a concentração de sulfidrilas reduzidas ligadas a proteínas. Devido ao efeito antioxidante do extrato oleoso de bixina, menores quantidades de radicais livres como o peróxido de hidrogênio e/ou hidroperóxidos lipídicos ficaram disponíveis para a reação de oxidação das sulfidrilas, com isso os níveis de sulfidrilas reduzidas foram maiores, comprovando o fato de que a bixina, como um carotenóide, possui efeito antioxidante.

**Proteínas totais, albumina e glicose**

O fígado é o único órgão responsável pela produção da albumina e é o responsável pelo metabolismo de proteínas e glicose, e dessa forma dosamos glicose, proteínas totais e albumina para observarmos se algum problema hepático estava acontecendo.

O nível de proteínas séricas circulante é dependente da taxa de biossíntese, do volume e das características de distribuição nos espaços intra e extravascular, da taxa de catabolismo ou de perda de proteínas e do desarranjo no balanço de fluidos corporais. A proteína ideal para ser um marcador no status nutricional deveria ter uma rápida taxa de síntese, um pequeno pool corporal, uma meia-vida curta, rápida taxa de catabolismo e ter poucos fatores que alterem sua distribuição e o seu catabolismo. As proteínas mais usadas na avaliação nutricional são a albumina, a transferrina e a pré-albumina, além da proteína ligada ao retinol e da somatomedina (Neto, 2003).

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 (Neto, 2003).

A albumina é a maior proteína produzida no fígado e a mais abundante no plasma, tendo uma meia-vida de 18 a 20 dias. Suas principais funções são a manutenção da pressão oncótica e o transporte de várias moléculas. Os níveis de albumina sérica são multiplamente determinados e relacionam-se direta e indiretamente com a função fisiológica, com a composição corporal e com o prognóstico clínico. Dessa forma, sugere-se que a albumina sérica, assim como outras proteínas exportadas pelo fígado, só deveria ser usada como marcador discreto do estado nutricional quando os outros fatores que influenciam o metabolismo e os níveis séricos estiverem ausentes (Neto, 2003).

A glicose é o principal carboidrato no sangue, desempenhando nos tecidos o papel de um combustível metabólico principal. É o principal substrato oxidável para a maioria dos organismos. De fato sua utilização como fonte energética pode ser considerada universal e, dos microrganismos ao homem, quase todas as células são potencialmente capazes de atender suas demandas energéticas apenas a partir desse carboidrato. A glicose é imprescindível para algumas células e tecidos, como hemácias e tecido nervoso, por constituir o único substrato que estes tecidos são capazes de oxidar para obter energia (Marzzoco e Torres, 1999).

A homeostase glicêmica é controlada pela ação de diversos hormônios, especialmente a insulina, que mantém o equilíbrio da concentração de glicose. Valores elevados de glicose ocorrem nos vários tipos de diabetes mellitus. A hipoglicemia de jejum ocorre em tumores pancreáticos e doenças hepáticas (Analisa, 1999).

Os nossos resultados (Tab. 9) demonstram que os animais dos grupos CBO e HBO obtiveram menores concentrações de proteínas totais, o que pode ser explicado pela menor ingestão alimentar, ou talvez por algum efeito da bixina.

Efeito redutor de proteínas com a utilização de bixina também foi encontrado por Lima et al., (2003), que observaram uma pequena diminuição da concentração de proteínas totais pelo tratamento isolado com bixina ou em associação com quercetina.

De Paula et al., 2005, também encontraram uma redução marcante nos níveis séricos de proteínas totais e que foi diretamente relacionada com a concentração de bixina utilizada (0,03% e 0,15%), sendo que nenhum efeito foi observado para os níveis de albumina.

Níveis de albumina e glicose coincidentemente foram maiores no grupo C, sendo os demais grupos estatisticamente iguais entre si, apresentando os menores valores.

Maciel, (2008), tratando hamsteres com torta de bixina observou efeitos semelhantes entre albumina e glicose, sendo coincidentemente os níveis de glicose e albumina menores nos animais que receberam dieta controle acrescida de bixina.

Estes dados sugerem então uma possível relação entre glicose e albumina. A síntese de albumina requer um adequado suprimento de aminoácidos (Peters, 1977) e energia (Nicholson et al., 2000) e é estimulada pela insulina, tiroxina e cortisol (Margarson e Soni, 1998) sendo que mudanças na pressão coloidosmótica no fluido intersticial são importantes reguladores (Nicholson et al., 2000). A albumina está envolvida também, no transporte de uma ampla variedade de substâncias fisiológicas como ácidos graxos de cadeia longa, bilirrubina, ácidos biliares, hormônios esteróides, tiroxina e pequenos íons (Margarson e Soni, 1998; Peters, 1997; Nicholson et al., 2000). Uma vez que os animais dos grupos H, CBO, HBO apresentaram redução de glicose sérica em comparação ao grupo controle, não sabemos se esta redução poderia estar interferindo na síntese de albumina, já que outros

fatores também podem estar envolvidos. A síntese de albumina e a homeostase da glicose são funções hepáticas, e pode ser que de alguma forma a bixina e a dieta hipercolesterolemiante estejam alterando esta função. Além disso, a oferta de energia parece ter importância na produção fisiológica de albumina, já que além de aminoácidos, a ingestão de energia influencia diretamente a sua síntese sob circunstancias fisiológicas (Princen et al., 1983).

# EXPERIMENTO 2

## Peso dos animais ao inicio do experimento, após quinze dias de adaptação às dietas, ingestão total, peso corporal final e peso de gordura abdominal

Ao início do experimento, e mesmo após o período de adaptação às dietas, todos os animais eram estatisticamente iguais entre si em relação aos seus valores de peso. Os valores de peso final foram maiores para os animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes e menores para aqueles tratados com bixina, os quais também tiveram menores valores de ingestão alimentar e menores pesos de gordura abdominal (Tab. 9 e 10).

## Perfil lipídico

Nossos resultados indicam que houve efeito da dieta e da bixina sobre as concentrações de colesterol total. As maiores concentrações séricas foram obtidas pelos animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes e as menores concentrações foram dos animais que receberam o tratamento com a bixina. Houve uma tendência de redução das concentrações de colesterol total de aproximadamente 14,5% no grupo CBO em relação ao grupo C e de aproximadamente 25,5% no grupo HBO em relação ao grupo H. (Tab. 13).

A associação de bixina à dieta hipercolesterolemiante foi a responsável por uma redução nos níveis de colesterol não-HDL nos animais do grupo HBO (redução de aproximadamente 53%). Adicionalmente, o tratamento com bixina elevou consideravelmente a concentração da fração HDL dos animais do grupo HBO, que tiveram conseqüentemente reduções expressivas de seu índice aterogênico em relação ao grupo H.

A adição de bixina à dieta hipercolesterolemiante reduziu as concentrações do colesterol hepático e fecal dos animais do grupo HBO em 43% e 42% respectivamente bem como as concentrações hepática e fecal de triacilgliceróis em 60% e 80% respectivamente.

Para as concentrações séricas de triacilgliceróis observamos que os animais do grupo H apresentaram uma redução deste parâmetro em 27,5% se comparados aos animais

do grupo C, o que corrobora com dados de Thomas-Moyá et al., (2007), que encontraram reduções nas concentrações séricas de triacilgliceróis em ratos que foram alimentados com dieta hipercolesterolemiante.

Ao analisarmos os grupos H e HBO quanto às concentrações de triacilgliceróis no soro e na gordura hepática e fecal, observamos resultados opostos. Enquanto no soro dos animais do grupo H, as concentrações de triacilgliceróis encontram-se reduzidas em relação aos animais do grupo HBO, na gordura hepática e fecal estas concentrações encontram-se elevadas. Esses dados sugerem então que um maior armazenamento hepático e uma maior excreção fecal de triacilgliceróis estariam ocorrendo nos animais do grupo H, e que estes fatores associados estariam sendo provavelmente os responsáveis pela redução da concentração dos triacilgliceróis no soro dos animais desse grupo, justificando assim as menores concentrações séricas observadas para este grupo em relação aos demais grupos.

**Função hepática**

Os maiores pesos para o fígado foram encontrados nos animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes (Tab. 12), o que corrobora com os dados obtidos em outros trabalhos.

Como ALT e AST têm distribuições distintas nas células, essas diferenças de distribuição têm 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).

Em geral, as causas mais comuns de elevação da ALT no sangue ocorrem por disfunção hepática. Desta maneira, além de ser mais sensível, ela é também bastante especifica para o diagnóstico de doença hepatocelular (Bacila, 1980; Analisa 1999). Entretanto, convém ressaltar que lesão tecidual nos rins, coração e nos músculos esqueléticos também provoca maior liberação da ALT para a corrente sanguínea, elevando seus níveis séricos. Assim, diante de um quadro clínico de miosite, os valores dessa enzima podem elevar-se tanto quanto na hepatite virótica aguda (Analisa 1999). A atividade da

ALT também é elevada na hepatite infecciosa, colestase intra-hepática, neoplasias do fígado e outras enfermidades hepáticas primárias ou secundárias (Bacila, 1980).

A ALT e a AST são importantes também no diagnóstico das lesões do coração. A oclusão de uma artéria coronariana por depósitos de lipídios pode causar anóxia local severa e finalmente degeneração de uma porção localizada no músculo cardíaco, sendo este processo chamado de infarto do miocárdio. Esta lesão faz com que essas enzimas, entre outras, saiam das células cardíacas lesadas para a corrente sanguínea. Dosagens dessas enzimas no soro sanguíneo podem oferecer informações importantes a respeito da severidade e do estágio da lesão do coração e do fígado (Lehninger, 1995).

Observamos um aumento na atividade de ALT para os animais dos grupos CBO e H e nenhuma alteração entre os grupos para a atividade de AST (Tab. 16).

Acreditamos que a elevação de ALT no soro dos animais do grupo CBO, seja devida a algum evento de proteólise celular, uma vez que estes animais tiveram uma perda significativa de massa durante o experimento, o que provavelmente pode ter levado a um quadro de degradação protéica (de fato houve uma tendência de redução nos níveis de proteínas totais e albumina para os animais deste grupo).

Já para os animais do grupo H, possivelmente uma lesão hepática relacionada à maior sobrecarga dietética de lipídios, estaria ocorrendo nos animais deste grupo, elevando assim os valores de ALT, o que foi corroborado por Maciel, (2008) e Beynen et al., (1987), que também obtiveram elevações de ALT e AST em animais tratados com dietas hipercolesterolemiantes. A associação de bixina á dieta hipercolesterolemiante, entretanto, reverteu estes valores, reduzindo a atividade de ALT, para valores estatisticamente iguais ao do grupo C, demonstrando ter efeitos protetores ao fígado.

Os animais do grupo H apresentaram a maior atividade de ALP e a suplementação de bixina à essa dieta fez com que houvesse uma redução dessa atividade nos animais do grupo HBO (Tab.16). Possivelmente, os animais do grupo H poderiam estar desenvolvendo um quadro de colestase intra ou extra-hepática, e o tratamento com bixina exerceu um efeito protetor, uma vez que reduziu a atividade dessa enzima.

**Função Renal**

Em nosso experimento observamos que nem a dieta nem o tratamento afetaram o peso total dos rins. Já para o peso relativo deste órgão observamos os maiores valores para os animais do grupo CBO (Tab. 11). Como o valor do peso relativo se dá em função da relação peso do órgão/peso corporal, maiores valores de peso relativo ocorreriam nos grupos de animais de menor peso corporal, que foi o que de fato ocorreu no grupo CBO, que teve uma perda de massa corporal bastante expressiva (Tab. 10).

Conforme discutido anteriormente, a uréia tem sua concentração afetada pela ingestão e degradação protéica, constituindo-se o principal produto do catabolismo de proteínas e aminoácidos.

Os animais tratados com bixina tiveram menores níveis de ingestão alimentar (e possivelmente menor ingestão protéica). Além disso, os animais do grupo CBO perderam muita massa, o que pode ter acelerado o catabolismo protéico, que resultou em níveis elevados de uréia.

Como a concentração de uréia não depende somente da filtração glomerular, mas também do fluxo urinário de sua produção, que depende da ingestão alimentar de protídeos e do catabolismo protéico endógeno, a creatinemia é um parâmetro muito mais válido para acompanhar a evolução de uma insuficiência renal que a uréia sanguínea (Frejaville, 1989).

A creatinina é o composto nitrogenado do sangue menos variável, sua taxa independe 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) .

A elevação da creatinina no sangue se dá na insuficiência renal, na nefrite incipiente, na glomerunefrite crônica. Nas obstruções urinarias, por afecções da próstata, bexiga e ureter, bem como oligúria reflexa provocada pela nefrolitíase verifica-se índices muito elevados, mas reversíveis pela remoção da causa da obstrução (Lima et al. 1985).

Observamos que os maiores índices de creatinina foram obtidos para os animais do grupo H, indicando uma possível insuficiência renal, e que a bixina reduziu os valores desse marcador nos animais dos grupos CBO e HBO para valores abaixo daqueles obtidos no grupo C, indicando um possível efeito de proteção celular (Tab. 17).

Estudos que analisaram o papel de lipídios na progressão das doenças renais sugerem que dislipidemias podem contribuir tanto para a progressão de aterosclerose quanto para doenças renais. Há evidencias de que anormalidades no metabolismo lipídico podem contribuir para a progressão de doenças renais. (Kees-Folts et al., 1993; Kasiske et al., 1988; Joles et al., 2000; Abrass, 2004).

Estes estudos sugerem que o colesterol dietético excessivo em animais experimentais poderia estar associado ao desenvolvimento de dano glomerular e que o tratamento de animais hiperlipidêmicos com drogas redutoras de lipídios possa prevenir o desenvolvimento de danos renais (Kamanna et al., 2000; Ferreira et al., 2005).

Estudos histológicos e histoquímicos em animais têm mostrado depósitos nos rins contendo colesterol, fosfolipídios, triacilgliceróis e LDL oxidado (Wheeler e Bernard, 1994). Ishiyama et al., (1999) analisando o papel de radicais livres e da peroxidação lipídica em glomerulosclerose induzida por lipídios, verificaram que a dieta hipercolesterolemiante causou dano renal em ratos e que radicais livres poderiam estar envolvidos neste processo.

Estudos em ratos mostraram que a hipercolesterolemia acelera a taxa de progressão da doença renal e que dietas ricas em colesterol levam a infiltração de macrófagos e formação de células em espuma (Hatori et al., 1999). Dados experimentais em animais

sugerem que tratamentos que corrigem hiperlipidemia possam ter um efeito positivo na função renal (Grone et al., 1994).

Lima et al., (2003), observaram em coelhos, maiores reduções dos níveis de creatinina nos grupos de animais que receberam bixina.

Fernandes et al., (2002) observaram uma pequena redução na concentração da uréia em camundongos. A concentração de creatinina foi reduzida em camundongos tratados com extrato de urucum em apenas um grupo (66 mg/Kg) e em ratos, nenhuma alteração foi observada na concentração de uréia e creatinina.

A relação uréia sanguínea/creatinina é um importante fator para melhor analisar, em face da concentração de uréia sanguínea elevada, o papel dos fatores renais e extra-renais (Frejaville, 1989). Assim, se considerarmos que os animais do grupo CBO apresentaram elevados valores de uréia, mas reduzidos valores de creatinina, isso reforça a hipótese de que são fatores extra-renais (no caso o catabolismo protéico) que estão influenciando em maiores elevações da uréia e descartamos a hipótese de que este aumento seja devido a um quadro de insuficiência renal, uma vez que os níveis de creatinina se encontram reduzidos e não elevados.

**Defesas antioxidantes**

Neste experimento observamos que os animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes apresentaram valores menores de grupos sulfidrilas totais e grupos sulfidrilas ligados à fração protéica se comparados aos animais que receberam dietas controle e os animais que receberam bixina apresentaram maiores valores de sulfidrilas livres se comparados aos animais isentos de tratamento (Tab. 18). Houve um aumento de aproximadamente 24% na concentração dos grupos sulfidrilas livres para os animais do grupo CBO em comparação aos animais do grupo C e um aumento de 12% para os animais do grupo HBO em comparação aos animais do grupo H.

Diante dos resultados obtidos, podemos observar que dietas hipercolesterolemiantes desencadeiam uma condição de maior estresse oxidativo, com maior produção de radicais

livres que, então reagem com os grupos sulfidrilas e levam à formação de pontes dissulfeto que conseqüentemente levam a uma redução das concentrações de sulfidrilas reduzidas. Pela análise dos nossos dados podemos observar que a bixina exerce um efeito antioxidante, minimizando a formação dessas pontes dissulfeto, sobretudo sobre os grupos sulfidrilas livres.

O transporte reverso do colesterol é considerado como a função principal da HDL na proteção do organismo contra a aterosclerose e distúrbios cardiovasculares, entretanto, vários estudos mostram mecanismos adicionais nas quais a HDL exerce essa proteção. Entre estes mecanismos a paraoxonase (PON), uma enzima componente da HDL, tem emergido para explicar a habilidade da HDL em metabolizar peróxidos de lipídios e proteger o organismo contra o acúmulo de LDL e a migração de monócitos (Durrington et al., 2001).

Até o momento três tipos de paraoxonase têm sido descritos: PON-1, PON-2 e PON-3. PON-1 é uma proteína de 354 aminoácidos, encontrada no cromossomo 7, que está distribuída entre os tecidos do fígado, rim, intestino e no soro. (Durrington et al., 2001). PON-2 é encontrada mais em tecidos, mas não na circulação, enquanto PON-3 está associada com a HDL como a PON-1 (Aviram, 2004).

Pelo fato de circular ligada a HDL, intensificando suas propriedades anti-aterogênicas, PON-1 desempenha importante papel na defesa antioxidante. Neste senso, PON-1 tem demonstrado ser efetiva na hidrólise de fosfolípides oxidados presentes em LDL (Thomás-Moyá et al., 2007), além de limitar o acúmulo de produtos da oxidação de lipídios em LDL e HDL, prevenir a transformação de LDL em partículas pro - aterogênicas e reverter os efeitos biológicos da LDL oxidada (Thomás-Moyá et al., 2006).

PON-1 tem sido relatada também em ter capacidade de proteger membranas citoplasmáticas de danos oxidativos (Durington, 2001) além de sua atividade peroxidase ao degradar peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$), uma das principais espécies reativas de oxigênio produzidas pelo estresse oxidativo durante a aterogênese (Shih et al., 2000).

O fígado desempenha um papal chave na síntese de PON-1 sérica e a sua expressão tem sido observada até o momento apenas neste órgão. Estudos bioquímicos *in vitro*

indicam que a PON-1 do fígado e do soro compartilham algumas propriedades (pH ótimo, afinidade por substrato, inativação por calor e dependência por cálcio) (Ferré et al., 2002).

No soro, PON-1 está quase exclusivamente localizada na HDL, e mudanças na forma e tamanho dessa lipoproteína podem afetar a sua afinidade de ligação e estabilidade e com isso reduzir a sua capacidade antioxidante (Durington, 2001). Os níveis séricos de PON podem variar amplamente entre diferentes espécies de animais e entre humanos. Indivíduos com hipercolesterolemia familiar e diabetes mellitus insulino dependentes tem níveis séricos de PON significativamente menores que indivíduos controles. Baixos níveis de esterases associadas a HDL também estão relacionados com a susceptibilidade a infartos do miocárdio e Doença de Tangier (Watson et al., 1995).

PON1 hidrolisa um grande número de compostos inseticidas e agentes nervosos (Richter et al., 2009) inclusive, o nome paraoxonase advém do fato de ela possuir habilidade em hidrolisar o paraoxon, o metabólito tóxico do inseticida paration (Costa et al, 1999). A paraoxonase sérica humana catalisa a hidrólise de ésteres carboxílicos aromáticos, organofosfatos e carbamatos (Watson et al., 1995).

Entre os pesticidas, compostos organofosfatos e carbamatos são os mais comumente usados devido às suas altas atividades inseticidas e persistência relativamente baixa. Estes pesticidas são tóxicos porque agem como inibidores da acetilcolinesterase, enzima que catalisa de forma eficiente a hidrólise da acetilcolina (Pedrosa et al., 2008).

Estudos com animais demonstraram que animais com baixos níveis de PON1 foram mais sensíveis aos compostos organofosfatos específicos, do que animais com elevados níveis dessa enzima. As aves, as quais possuem baixas ou indetectáveis atividades de PON1, são mais sensíveis à toxicidade aguda do paraoxon do que vários mamíferos. E os coelhos, que possuem atividade sérica de PON1 sete vezes maior que ratos, são quatro vezes mais resistentes à toxicidade aguda do paraoxon (Costa et. al. 1999).

Experimentos de Costa et. al. (1999) com ratos têm mostrado convincentemente que PON1 desempenha um papel importante na desintoxicação de compostos organofosforados através da via P450: PON1 e atualmente, existe um esforço em curso para identificar genes e polimorfismos (Costa et. al. 1999).

Nas populações humanas, PON1 apresenta polimorfismos dependentes do substrato. A isoforma Arg192 hidrolisa rapidamente o paraoxon, mas hidrolisa lentamente diazoxon, soman e sarin. Por outro lado, a isoforma Gln192 hidrolisa o paraoxon lentamente, mas o diazoxon, soman e sarin mais rapidamente do que a isoforma Arg192 (Costa et. al. 1999).

Estudos envolvendo a análise do efeito da bixina sobre a atividade da PON e em animais submetidos a dietas hipercolesterolemiantes são pouco 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 a oxidação da LDL (Aviram et al., 1998). A presença de PON na HDL pode ser um contribuinte importante para antiaterogenicidade dessa lipoproteína e dados sobre a atividade desta enzima podem nos fornecer indícios sobre o status oxidativo em modelos animais.

Em nosso experimento foram dosadas as atividades arilesterase e paraoxonase da PON, que utilizava como substrato o fenilacetato e o paraoxon respectivamente. Nossos resultados indicaram que as menores atividades tanto arilesterase quanto paraoxonase foram obtidas pelos animais do grupo H e que as maiores atividades foram obtidas pelos animais do grupo C (Tab. 19), o que corrobora com dados de Thomás-Moyá et al., (2007) que verificaram uma redução da atividade paraoxonase em ratos machos e fêmeas que consumiram uma dieta rica em gorduras e com dados de Ayub et al., (1999), Aviran et al., (1998) e Shih et al., (1996) que demonstraram que animais alimentados com dietas ricas em gorduras e colesterol apresentaram redução na expressão gênica e na atividade sérica da PON.

A oxidação de LDL é influenciada pela dieta, que altera tanto a susceptibilidade da LDL à oxidação quanto à atividade da PON sérica (Watson et al., 1995 e Ribas et al., 2004). Assim, como a resposta da PON está relacionada à ingestão de gorduras, o consumo de alimentos ricos em gorduras, bem como dietas hipercolesterolemiantes têm sido associadas com uma redução da atividade da PON tanto em camundongos quanto em coelhos (Thomás-Moyá et al., 2007).

Observamos ainda, que a bixina quando associada à dieta hipercolesterolemiante provocou uma elevação de aproximadamente 58% da atividade da arilesterase e uma elevação de 71% da atividade paraoxonase da PON, o que pode ser explicado tanto pelas maiores concentrações de HDL observadas nos animais do grupo HBO, quanto por uma possível atuação da bixina.

Rossoni Jr. (2008), encontrou reduções na atividade da PON em animais que receberam dietas controle acrescida de tratamentos com torta de bixina (0,015% e 0,075%) e infusão aquosa de urucum, corroborando com nossos dados onde, a adição de bixina à dieta controle provocou reduções de cerca de 40% nas atividades arielterase e paraoxonase da PON nos animais do grupo CBO, mesmo estes animais possuindo concentrações de HDL estatisticamente iguais aos animais dos grupos C e HBO.

**Proteínas totais, albumina e glicose**

Neste experimento não observamos nenhuma diferença estatística para os níveis de glicose entre os grupos (Tab. 20). Além disso, os animais dos grupos H e HBO apresentaram as maiores concentrações de proteínas totais e albumina sugerindo que o metabolismo hepático de glicose, albumina e proteínas não estão sendo comprometidos, mesmo tendo os animais do grupo H apresentado variações nos níveis de ALT. Os animais do grupo CBO também tiveram alterações da ALT e apresentaram apenas uma tendência de redução nas concentrações de proteínas totais. Para a albumina, houve efeito da bixina onde os animais dos grupos CBO e HBO apresentaram as menores concentrações, sem refletir, entretanto em menores concentrações de proteínas totais.

# EXPERIMENTO 3

**Peso dos animais ao inicio do experimento, após quinze dias de adaptação às dietas, ingestão total, peso corporal final e peso de gordura abdominal.**

Ao início do experimento todos os animais eram estatisticamente iguais entre si em relação aos seus valores de peso, mas após 15 dias de adaptação às dietas, estes valores alteraram e os animais que receberam as dietas hipercolesterolemiantes passaram a apresentar os maiores valores de peso. Além disso, mesmo apresentando menores valores de ingestão alimentar, estes animais apresentaram maiores valores de massa corporal ao fim do experimento e maiores acúmulos de gordura abdominal (Tab. 21).

Conforme discutido anteriormente, os ratos se alimentam com base no valor calórico da dieta. Sabendo-se que alimentos ricos em gordura acondicionam muitas calorias em um pequeno volume de alimento é de se esperar uma menor ingestão alimentar para os animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes, o que foi corroborado com nossos dados. O que surpreendentemente mudou foi que os animais que receberam bixina, desta vez apresentaram maiores valores de ingestão em relação aos animais que não receberam a bixina, o que não havia ocorrido nem em machos e nem em fêmeas quando a dieta oferecida era a AOAC. Mas ainda assim, os animais dos grupos CBO e HBO apresentaram valores de ganho de massa e de peso corporal final inferiores aos animais dos grupos C e H.

**Perfil lipídico**

Os nossos resultados para o perfil lipídico indicam que houve interação entre dieta e bixina sobre as concentrações de colesterol total, onde maiores níveis séricos foram encontrados nos animais que receberam dieta hipercolesterolemiante associada com bixina. E este aumento foi surpreendente e contraditório àqueles observados nos experimentos anteriores onde se utilizou a dieta AOAC (Tab. 24).

A bixina associada à dieta hipercolesterolemiante foi responsável por uma elevação dos níveis de colesterol total e colesterol não-HDL nos animais do grupo HBO em relação ao grupo H (elevação de aproximadamente 37% e 40% respectivamente). Apesar das

concentrações de HDL dos grupos HBO e H serem estatisticamente iguais entre si, a elevação da concentração do colesterol não-HDL no grupo HBO, foi responsável pela elevação do índice aterogênico em aproximadamente 75% neste grupo de animais em relação ao grupo H. Quando associada à dieta controle, a bixina elevou os níveis de colesterol HDL dos animais do grupo CBO em 27,5% sem, entretanto alterar o índice aterogênico dos animais deste grupo, o qual foi estatisticamente igual ao dos animais do grupo C.

Quanto aos triacilgliceróis observamos que os animais que receberam as dietas hipercolesterolemiantes apresentaram menores concentrações se comparadas aos animais que receberam dietas controle e que o tratamento com bixina reduziu as concentrações séricas deste lipídio. Embora não tenha havido diferenças estatísticas entre os grupos de animais, o grupo HBO apresentou uma tendência em ter uma menor concentração sérica de triacilgliceróis em relação aos demais grupos, e assim como proposto no experimento 2, a explicação pode estar relacionada com as concentrações de triacilgliceróis obtidas na gordura hepática e fecal. Os animais deste grupo obtiveram as maiores concentrações de triacilgliceróis na gordura do fígado e das fezes, e isto fez com que o acúmulo de triacilgliceróis no fígado e sua excreção nas fezes ocasionassem na redução de sua concentração no soro.

Nossos resultados indicam que a bixina exerce efeitos sobre o metabolismo de lipídios, entretanto, o aumento dos níveis de colesterol total e das frações aterogênicas do colesterol observado nos animais do grupo HBO, tratados com a dieta AIN-93 foi um resultado inesperado em relação aos resultados obtidos para os animais tratados com a dieta AOAC, indicando efeitos diferenciados da bixina em relação às dietas de referência, uma vez que não se observou o efeito hipocolesterolemiante da bixina na dieta AIN-93 como havia ocorrido nos experimentos anteriores, onde a dieta oferecida era a AOAC.

Como a dieta estaria influenciando estes resultados? Quais são as diferenças mais marcantes na composição das dietas AOAC e AIN-93? Como explicar o paradoxo de redução e aumento de colesterol pelo uso de bixina?

Ao compararmos nossos resultados, percebemos que as principais alterações do perfil lipídio ocorrem quando a bixina está associada à dieta hipercolesterolemiante, e se compararmos a composição das dietas AOAC e AIN-93 em relação às dietas H e HBO perceberemos que a maior variação ocorre em relação aos teores de fibra contidos nestas dietas. O teor de fibra (celulose) na dieta AOAC para os animais dos grupos H e HBO é de 13%, sendo este teor de apenas 5% na dieta AIN-93. Essa diferença faz com que a relação fibra/bixina na dieta AOAC seja de 86,66 e na dieta AIN-93 seja de 33,33, e provavelmente, a diferença desta relação se relaciona com os efeitos antagônicos observados nas concentrações séricas do colesterol.

Uma grande quantidade de publicações tem relatado o efeito de varias intervenções dietéticas na redução do colesterol. Como terapia suplementar a uma dieta reduzida em gorduras, a ingestão de fibras solúveis dietéticas mostrou fortes evidências na atividade redutora do colesterol. (Zunft et al. 2003). Assim, a administração de pectina, goma guar, psilium, farelo de cevada de trigo e aveia tem sido relatadas em reduzir o colesterol total ou LDL em diversos estudos, tanto em animais quanto em humanos (Jonnalagadda et al., 1993; Anderson, 1994; Silva et al., 2003; Behall et al., 2004).

Adicionalmente, o foco das pesquisas de fibras dietéticas tem sido estendido na prevenção de diabetes mellitus, obstrução cardíaca e câncer do cólon. As fibras insolúveis em especial têm mostrado serem efetivas na prevenção de tumores induzidos em ratos, mas pouco é conhecido sobre seus efeitos sobre os lipídios sanguíneos.

Recentemente, mostrou-se que fibras insolúveis da polpa de alfarrobeira têm sido encontradas em afetar os lipídios sanguíneos de animais de uma maneira semelhante às fibras solúveis. A fruta da árvore da alfarrobeira contém fibras insolúveis e polifenóis (taninos) e é suspeita de ter efeitos benéficos sobre a saúde humana. Em estudos com roedores, preparações da polpa e da semente da alfarrobeira, ricas em fibras insolúveis, demonstraram efeitos redutores de colesterol e aumento na excreção de ácidos biliares. E em um estudo clínico piloto, a fibra de alfarrobeira indicou ser efetiva na redução das concentrações de colesterol total e LDL em humanos. (Zunft et al., 2001).

Zunft et al., (2003) realizaram um estudo onde 15g diárias de fibra de alfarrobeira foram administradas a voluntários por um período de seis semanas (onde dessas 15g, 10,26 eram fibras insolúveis). Após o período experimental, verificou-se que o consumo da fibra reduziu o colesterol LDL, reduziu a razão de colesterol LDL/HDL em homens e mulheres e reduziu os níveis de triacilgliceróis particularmente em mulheres.

Em outro estudo, utilizando a fibra de alfarrobeira, Grundel et al. (2006), administrou doses de 0, 5, 10 ou 20g em pessoas saudáveis e observou uma redução de 97,2% dos níveis de triacilgliceróis em uma maneira dose dependente, bem como uma redução nos níveis de ácidos graxos não esterificados em 67,2% comparados ao grupo placebo.

Anderson et al., (1994) em um estudo comparativo sobre os efeitos de fibras solúveis e insolúveis em rato Sprague-Dawley, observaram que os menores níveis de triacilgliceróis foram obtidos para os animais tratados com farelo de arroz, uma fonte predominantemente de fibra insolúvel.

Silva et al., (2003) observaram o efeito do tratamento com farelo de aveia e trigo em ratos Wistar. O farelo de aveia é constituído por cerca de 1,2% de fibra bruta e 9,7% de fibra alimentar total, onde 3,5% representam a s fibras solúveis e 6,2% fibras insolúveis.O teor de fibra alimentar presente no trigo encontra-se em torno de 47,31% e, desse total o teor de fibra insolúvel é de 86% e o de fibra solúvel de 14%.Neste experimento, onde ambos farelos possuíam teores significativos de fibras insolúveis, observou-se um efeito positivo do farelo de aveia sobre os níveis séricos de colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triacilgliceróis, e um efeito redutor dos níveis de triacilgliceróis para o tratamento com farelo de trigo.

Jonnalagada et al., (1993) estudando os efeitos de fibras em hamsteres previamente hipercolesterolêmicos, observou que a celulose foi a responsável pela maior redução dos níveis séricos de VLDL+LDL entre os grupos analisados (redução de 40%).

Embora a maioria dos trabalhos correlacione a redução do colesterol ao tratamento com fibras solúveis e apesar de os mecanismos de ação das fibras solúveis e insolúveis sobre os parâmetros relacionados ao metabolismo de colesterol não estejam totalmente

esclarecidos, os nossos resultados sugerem uma possível atuação positiva da celulose (fibra insolúvel) sobre o perfil lipídico de ratos hipercolesterolêmicos, uma vez que os animais tratados com a dieta AOAC, a qual possuía maior teor de celulose, apresentaram melhores respostas com relação ao perfil lipídico se comparados aos animais que receberam a dieta AIN-93, a qual possuía menor teor de celulose.

Os mecanismos de como o colesterol sanguíneo é influenciado parecem ser diferentes entre as fibras solúveis e insolúveis. Enquanto as fibras solúveis reduzem o colesterol sérico principalmente por um efeito de solubilização de lipídeos, as fibras insolúveis são capazes de adsorver os ácidos biliares no quimo, como foi demonstrado em muitos estudos *in vivo* e *in vivo.* Esta ligação resulta em uma aumentada perda fecal de ácidos biliares, escape da circulação enterohepática, e um maior consumo de colesterol endógeno da síntese *de novo* do colesterol, exaurindo assim o "pool" de colesterol no soro (Neves, 1997; Zunf et al., 2003). Além disso, parece que as fibras insolúveis, por diminuírem o tempo de trânsito intestinal podem agir diminuindo a absorção de gorduras e triacilgliceróis, provocando um pequeno aumento na quantidade de gordura fecal e possível diminuição dos níveis de triacilgliceróis séricos (Raupp, 1994; Costa et al., 1997).

Recentes estudos em hamsteres indicaram que a potencial redução do colesterol LDL por fibra de alfarrobeira é acompanhada por um aumento de excreção de ácidos biliares de uma forma dose dependente. Assim, um aumento dose-dependente na atividade da CYP7$\alpha$1 tem sido observado.

A ligação de ácidos biliares às fibras no lúmen intestinal além de resultar em perda fecal de ácidos biliares, leva a uma menor solubilização do colesterol, que tem sua absorção reduzida nas membranas dos enterócitos e uma maior perda fecal (van Bennekum et al., 2005).

Chau e Huang (2005), analisando a influência de uma fração rica em fibra insolúvel, preparada de sementes de *Passiflora edulis* em hamsteres hipercolesterolêmicos, observaram que o consumo dessa fração foi responsável em diminuir os níveis de triacilgliceróis e de colesterol total sérico e hepático, além de aumentar os níveis de lipídios

totais, colesterol e ácidos biliares em fezes, as quais se apresentavam mais volumosas e úmidas.

Wilson et al., (1998) administraram cholazol H, uma fibra dietética insolúvel, quimicamente funcional, e colestiramina em hamsteres machos Golden Syrian hipercolesterolêmicos durante seis semanas, e observaram uma redução nos níveis de colesterol plasmático de –37% e –30% para colestiramina e cholazol H respectivamente e uma redução do VLDL plasmático de -45% para colestiramina e -36% para cholazol H. Estes mesmos autores realizaram um segundo experimento, de duração de quatro semanas, onde houve alteração na dieta hipercolesterolemiante aplicada e constataram reduções nos níveis de colesterol total e colesterol não HDL, bem como uma maior concentração de ácidos biliares totais nas fezes (aumento de 39% e 28% para cholazol H e colestiramina respectivamente). Além disso, cholazol H aumentou a excreção fecal de ácido cólico e acido deoxicólico em 48% e 56% respectivamente.

O bagaço de cenoura (*Daucus carota*) é rico em fibras insolúveis (56,3g/100g de bagaço), e é composto principalmente de polissacarídeos pécticos, hemicelulose e celulose. Hsu et al. (2006) administraram, durante 6 semanas, em hamsteres, uma dieta contendo fibras insolúveis extraídas do bagaço de cenoura e compararam com uma dieta contendo celulose e uma dieta isenta em fibras. O isolado de fibras insolúveis do bagaço da cenoura mostrou ter efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico, reduzindo as concentrações séricas de triacilgliceróis, colesterol total e colesterol hepático. Além disso, aumentou o peso das fezes, os lipídios fecais, a quantidade de colesterol fecal e o conteúdo de ácido biliar fecal, sugerindo assim, que estes resultados poderiam ser atribuídos a sua habilidade em aumentar a excreção de colesterol, lipídios e ácido biliar por meio das fezes.

Van Bennekun et al., (2005) avaliaram os efeitos da colestiramina, da quitosana e da celulose em camundongos fêmeas hipercolesterolêmicos e estudaram os possíveis mecanismos de atuação destas fibras sobre as concentrações séricas e hepáticas do colesterol e sobre a excreção de ácidos biliares, sabendo-se que elas tinham alta, intermediaria e baixa capacidade de ligação aos ácidos biliares respectivamente. As três fibras foram eficientes em reduzir o colesterol sérico e hepático, sendo a redução mais

pronunciada nos animais tratados com colestiramina. Segundo os resultados dos autores, as três fibras foram capazes de induzir a saciação e saciedade nos animais resultando em menor ingestão e armazenamento de colesterol. Adicionalmente, a colestiramina foi capaz de reduzir a eficiência da absorção intestinal do colesterol, bem como aumentar a excreção fecal de ácidos biliares e colesterol, devido a sua alta capacidade de ligação aos ácidos biliares.

Os resultados destes autores sugerem ainda, que os efeitos de saciação e saciedade contribuíram significativamente para as propriedades de redução do colesterol nos camundongos tratados com celulose e quitosana, sendo este achado consistente com um estudo prévio de (Trautwein et al., 1997), que demonstraram que a incorporação da quitosana em dietas de hamsteres levou a uma redução na ingestão alimentar e a um efeito redutor do colesterol.

Embora a abordagem deste trabalho não nos permita propor mecanismos, acreditamos que a bixina esteja agindo sinergicamente com a celulose na redução do colesterol. Possíveis aumentos na expressão e/ou atividade da CYP7$\alpha$1, estariam ocorrendo nos animais tratados com bixina, o que levaria a um aumento na produção de ácidos biliares, os quais se adsorveriam às fibras da dieta. Esta ligação faria com que os ácidos escapassem da circulação êntero-hepática e fossem eliminados pelas fezes provocando assim um maior consumo de colesterol endógeno para produção de ácidos biliares adicionais e uma conseqüente redução do pool de colesterol sérico.

É possível, que o efeito de conversão de colesterol a ácidos biliares e a sua posterior adsorção às fibras possam estar ocorrendo mais pronunciadamente nos animais tratados com a dieta AOAC (a qual possui maior teor de celulose) explicando assim a redução dos níveis de colesterol plasmático ocorrido nos experimentos 1 e 2. Nos animais tratados com dieta AIN-93 esta adsorção ocorreria com menor intensidade e os ácidos biliares poderiam estar sendo reciclados através da circulação êntero-hepática. Além disso, na dieta AOAC, a maior quantidade de celulose também pode ter sido a responsável em induzir a saciação e saciedade nestes animais, que também tiveram menores valores de ingestão e

possivelmente um menor armazenamento de colesterol em comparação aos animais que receberam a dieta AIN-93.

Para se conhecer os reais mecanismos de atuação da bixina sobre o metabolismo de lipídios, além das dosagens bioquímicas realizadas, estudos adicionais se fazem necessários, e nessa perspectiva estudos sobre a expressão e atividade da CYP7$\alpha$1, além da dosagem de ácidos biliares nas fezes seriam metodologias adequadas para responder questões ainda não totalmente esclarecidas.

Investigações da celulose em estudos clínicos são muito intrigantes, porque o efeito hipocolesterolêmico da celulose não tem sido estabelecido tão claramente ainda (Chen e Anderson, 1979), embora a ingestão de altas concentrações de celulose como um alimento suplementar foi relatado em reduzir o colesterol sérico em cerca de 25% em humanos num estudo realizado por Shurpalekar et al (1971).

O conhecimento sobre os mecanismos pelos quais as diferentes fibras previnem o acúmulo de colesterol pode ser útil em investigações clínicas dos efeitos da terapia com fibras. Um possível efeito benéfico das fibras sobre os riscos cardiovasculares pode estar relacionado aos diferentes mecanismos pelos quais elas influenciam o metabolismo lipídico. Assim em estudos futuros, o efeito sobre a morbidade e mortalidade vascular, bem como a ocorrência de efeitos colaterais, devem ser avaliados separadamente para cada tipo de fibra (van Bennekum et al., 2005).

**Função Hepática**

Os animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes apresentaram maiores valores de peso total e peso relativo do fígado (Tab. 23), maior porcentagem de gordura hepática e maiores concentrações hepáticas de colesterol (Tab. 25). Além disso, essas dietas elevaram as concentrações de ALT, AST e ALP. Apesar de o tratamento com bixina não alterar as concentrações de ALT e AST, observamos que a sua associação à dieta hipercolesterolemiante foi responsável pela elevação da concentração de ALP do grupo HBO. Esses dados conjuntamente sugerem então que um quadro de dano hepático e

colestase podem ter sido provocados pela dieta hipercolesterolemiante e/ou bixina (Tab. 25).

**Função Renal**

Neste experimento observamos que o peso dos rins foi maior para os animais do grupo H, mas estes animais também apresentaram os maiores pesos ao final do experimento, o que fez com que seu peso relativo fosse estatisticamente semelhante ao dos animais dos demais grupos. Nem a dieta nem a bixina afetaram as concentrações de uréia, e a bixina associada à dieta controle reduziu as concentrações séricas de creatinina, (Tab. 28) trazendo então um efeito nefroprotetor para os animais do grupo CBO, conforme discutido anteriormente.

**Defesas antioxidantes**

Para o grupo sulfidrilas, observamos que a bixina exerceu um efeito antioxidante significativo, elevando as concentrações de sulfidrilas reduzidas. A bixina aumentou a concentração de sulfidrilas livres e sulfidrilas ligadas a proteínas, levando conseqüentemente a um aumento acentuado na concentração de sulfidrilas totais (Tab. 29).

Houve um aumento de aproximadamente 77,5%, 39% e 88 % nas concentrações de sulfidrilas totais, sulfidrilas livres e sulfidrilas ligadas a proteínas respectivamente nos animais do grupo CBO em comparação ao grupo C. E para os animais do grupo HBO, houve aumentos de aproximadamente 79%, 14% e 99% nas concentrações de sulfidrilas totais, sulfidrilas livres e sulfidrilas ligadas a proteínas respectivamente em comparação ao grupo H.

Neste experimento, assim como o discutido anteriormente, os animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes apresentaram as menores atividades arilesterase e paraoxonase e os animais que receberam dietas controle apresentaram as maiores atividades (Tab. 30).

A bixina associada à dieta controle elevou a atividade arilesterase da PON em 60,34% em relação aos animais que receberam a dieta controle sem acréscimo de bixina, e nenhum efeito foi observado para esta atividade quando a bixina foi associada à dieta hipercolesterolemiante. Estes resultados corroboram com os dados obtidos para HDL, onde os animais do grupo CBO apresentaram maiores concentrações dessa lipoproteína e os animais dos grupos H e HBO apresentaram as menores concentrações e foram estatisticamente iguais entre si (Tab. 24). Fato interessante foi que a bixina associada à dieta controle elevou os níveis de HDL em 27,5% e elevou a atividade arilesterase de PON em 60,34%, ou seja, o aumento da atividade de PON foi o dobro em relação ao aumento da concentração de HDL. O que possivelmente pode estar havendo é um aumento da atividade e/ou expressão de PON de forma independente da concentração de HDL, nos levando a supor que este efeito seja devido a uma atuação da bixina.

Para a atividade paraoxonase não houve diferenças entre os animais dos grupos C e CBO e houve uma redução da atividade paraoxonase da PON quando a bixina foi associada à dieta hipercolesterolemiante.

**Proteínas totais, albumina e glicose**

Os animais dos grupos H e HBO apresentaram maiores concentrações de proteínas totais e glicose em relação aos demais grupos (Tab. 31) e apesar destes mesmos grupos apresentarem elevações nos marcadores hepáticos (ALT, AST e ALP) possivelmente o metabolismo hepático de glicose e proteínas totais não foi afetado uma vez que as concentrações desses metabólitos estão elevadas e não reduzidas. Apesar de os níveis de proteínas totais serem os menores para os animais que receberam bixina, estes mesmos animais apresentaram as maiores concentrações de albumina. E fazendo uma correlação com a função antioxidante, esta elevação dos níveis de albumina pode ter sido responsável pelo aumento na concentração das sulfidrilas ligadas a proteínas, uma vez que a albumina é a principal fonte de grupos sulfidrilas do plasma e é o mais importante componente extracelular de defesa antioxidante.

# CONCLUSÃO

# CAPÍTULO 7 – CONCLUSÃO

## EXPERIMENTO 1

As dietas oferecidas e o tratamento com o extrato oleoso de bixina em machos que receberam dieta AOAC nos forneceram os seguintes resultados:

- As dietas hipercolesterolemiantes foram efetivas em elevar as concentrações do colesterol total e do colesterol não-HDL, elevar o índice aterogênico e reduzir a concentração do colesterol HDL;
- A associação de bixina à dieta hipercolesterolemiante reduziu as concentrações do colesterol total, do colesterol não-HDL, o índice aterogênico e a quantidade de gordura hepática e fecal dos animais do grupo HBO;
- A associação de bixina à dieta controle elevou as concentrações do colesterol HDL nos animais do grupo CBO;
- A bixina exerceu efeito hipotrigliceridêmico quando associada tanto à dieta controle quanto à dieta hipercolesterolemiante;
- A bixina reduziu a atividade de ALT quando associada à dieta hipercolesterolemiante e reduziu a atividade de AST quando associada às dietas controle e hipercolesterolemiante;
- A bixina elevou a atividade de ALP;
- A bixina reduziu as concentrações de uréia;
- A bixina elevou as concentrações dos grupos sulfidrilas totais e livres.

## EXPERIMENTO 2

As dietas oferecidas e o tratamento com o extrato oleoso de bixina em fêmeas que receberam dieta AOAC nos forneceram os seguintes resultados:

- As dietas hipercolesterolemiantes foram efetivas em elevar as concentrações do colesterol total e do colesterol não-HDL e o índice aterogênico;
- A associação de bixina à dieta hipercolesterolemiante reduziu a concentração do colesterol não-HDL, o índice aterogênico, a quantidade de gordura hepática e as concentrações de colesterol e triacilgliceróis hepáticos e fecais do grupo HBO;
- A associação de bixina à dieta hipercolesterolemiante elevou as concentrações do colesterol HDL e dos triacilgliceróis nos animais do grupo HBO;
- Os animais dos grupos CBO e HBO tiveram valores de ingestão menores que os animais dos grupos C e H;
- Os animais do grupo CBO apresentaram elevações na atividade de ALT, e os animais do grupo H apresentaram elevações de ALT e ALP. Nenhuma alteração foi observada para a atividade de AST;
- Os animais do grupo CBO apresentaram elevações nas concentrações de uréia, e a bixina reduziu as concentrações de creatinina dos grupos CBO e HBO;
- A bixina elevou as concentrações dos grupos sulfidrilas livres nos grupos CBO e HBO;
- A bixina elevou as atividades arilesterase e paraoxonase da PON no grupo HBO.

## EXPERIMENTO 3

As dietas oferecidas e o tratamento com o extrato oleoso de bixina em fêmeas que receberam dieta AIN-93 nos forneceram os seguintes resultados:

- As dietas hipercolesterolemiantes foram efetivas em elevar as concentrações do colesterol total e do colesterol não-HDL, elevar o índice aterogênico e reduzir a concentração do colesterol HDL;
- A associação de bixina à dieta hipercolesterolemiante elevou as concentrações do colesterol total e do colesterol não-HDL, elevou o índice aterogênico, a quantidade de gordura fecal e os triacilgliceróis fecais dos animais do grupo HBO;
- A associação de bixina à dieta controle elevou as concentrações do colesterol HDL e dos triacilgliceróis hepático dos animais do grupo CBO;
- Dietas hipercolesterolemiantes elevaram a quantidade de gordura no fígado, elevaram a concentração hepática do colesterol bem como as atividades séricas de ALT, AST e ALP;
- Reduções da creatinina sérica foram observadas nos animais do grupo CBO. Não houve alterações na concentração de uréia;
- A bixina elevou as concentrações dos grupos sulfidrilas livres no grupo CBO, e elevou a concentração de grupos sulfidrilas totais e ligados à fração protéica;
- A bixina elevou a atividade arielterase da PON no grupo CBO.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrass, C. K. (2004) Cellular Lipid Metabolism and the Role of Lipids in Progressive Renal Disease. *Am. J. Nephrology,* 24:46–53.

Anger, A.R., Barbican, L.F., Scolastici, C., Salvadori, D.M.F. (2004). Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 1687-1693.

Aligiannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 4168-4170.

Alves de Lima, R.O., Azevedo, L., Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F. (2003). Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 189-192.

ANALISA, (1999). Técnicas Analíticas, p.40.

Anderson, J.W., Jones, A.E., Riddell-Mason, S. (1994). Ten different dietary fibers have significantly different effects on serum and liver lipids of cholesterol-fed rats. *J. Nutr*., 124: 78-83.

Antunes, L.M.G., Pascoal, L.M., Bianchi, M.L.P., Dias, F.L. (2005). Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 585: 113-119.

AOAC (1980) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

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., 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 estresse, and cardiovascular diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, 37: 1301-1303.

Ayub, A., Mackness, M. L., Arrol, S., Mackness, B., Patel, J., Durrington, P. N. (1999). Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Atheriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2: 330-335.
Bacila, M. Bioquímica Veterinária.(1980). Varela: São Paulo, p. 197-211.

Bachorik, P. S., Rifkind, B. M., Kwiterovich, P. O. (2000). Lypids and dyslipoproteinemia. *Clinical Chemistry*, 10: 208-236.

Balaswamy, K., Prabhakara Rao, P.G., Satyanarayana, A., Rao, D.G. (2006). Stability of bixin in annatto oleoresin and dye powder during storage. *Food Science and Technology*, 39: 952-956.

Barbosa-Filho, J.M. (2006). *Bixa orellana*: Retrospectiva de usos populares, atividades biológicas, fitoquímicas e emprego na fitocosmética, no Continente Americano. In: Simpósio Brasileiro do Urucum. p. 1-14. João Pessoa.

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

Batlouni, M. (1997). Hipótese oxidativa da aterosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronária. *Arq, Bras. Cardiol*., 68(1): 55-63.

Bautista, A.R.P.L., Moreira, E.L.T., Batista, M.S., Miranda, M.S., Gomes, I.C.S. (2004). Subacute toxicity assessment of annatto in rat.*Food and Chemical Toxicology*, 42: 625-629.

Behall, K.M., Scholfield, D.J., Hallfrisch, J. (2004a). Diets containing barley significantly reduce lipids in midly hypercholesterolemic men and women. *Journal of the American College of Nutrition*, 80(5): 1185-1193.

Beltowski, J., Wojcicka, G., Jamroz, A. (2002). Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. *Pol. J. Pharmacol*., 54: 661-671.

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

Beynen, A.C., Katan, M.B., Van, Z.L.F.M. (1987). Hypo and hyper responders: individual differences in the responses of serum cholesterol concentration to changes in diet. *Adv. Lipid Res*., 22: 115-171. In: Ness, C.N., Chambers, C.M. (2000). Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroy-3-methylglutaril coenzime A reductase: The concept of cholesterol buffering capacity. *P.S.E.B.M*, 224: 8-19.

Bouvier, F., Dogbo, O., Camara, B. (2003). Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). Science, 300(5628): 2089-2091.

Braga, F.G., Bouzada, M.L.M., Fabri, R.L., Matos, M.O., Moreira, F.O., Scio, E., Coimbra, E.S. (2007).Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil.*Journal of Ethnopharmacology*, 111: 396-402.

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., 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.

Cai, Q., Ranhn, R.O., Zhang, R.(1999). Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. Cancer Letters; 119: 99-107.

Canadian Council on Animal Care (CCAC) (1984) Guide to the care and use of experimental animals. Ottawa.

Candido, L.M.B., Campos, A.M. (2005). Alimentos Funcionais - Uma revisão. Boletim da SBCTA, v.29, n. 2, p.193-203.

Carvalho, P.R.N. e Hein, M. (1989). Urucum – uma fonte de corante natural. Coletânea ITAL, Campinas, 19(1): 25-33.

Carvalho, F.R., Toledo, T.O., Nagem, T.J., Stringheta, P.C., Júnior, D.B.F. (2004). Effect of the naringenine and bixin associated with goat milk on lipid metabolism of rabbits. *Rev. Chil. Nutr*., 21(1): 177-182.

Castro, M.S. 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 $CO_2$ supercrítico. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos/FEA/Unicamp, São Paulo.

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.

Chau, C.F., Huang, Y.L. (2005). Effects of the insoluble fiber derived from *Passiflora edulis* seed on plasma and hepatic lipids and fecal output. *Mol. Nutr. Food.Res.*, 49(8): 786-90.

Chen, W.J.L., Anderson, J.W. (1979). Effects of plant fiber in decreasing plasma total cholesterol and increasing high-density lipoprotein cholesterol.*Proc.Soc. Exp. Biol.Med.* 162: 310–313.

Chiang, J.Y.L. (1998). Regulation of bile acid synthesis. *Front. Biosci*., 3: 176-193.

Chiang, J.Y.L. (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 e Processing International,* 23: 23-27.

Cooper, A. D. (1997). Hepatic uptake of chylomicron remmants. *J. Lipid Res*., 38: 2173-92.

Cooper, J.A., Muller, G.J., Humphries, S. E. (2005). A comparisom 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.

Cortella, A., Pochettino, M.L. (1997). Analisis y evaluacion de los tes comercializados para el tratiamento del colesterol. *La Alimentacion Latinoamericana,* 31(217):49-57.

Costa, R.P., Silva, C.C., Magnoni, C.D. (1997). Importância das fibras na prevenção de doenças cardiovasculares. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica,* v.12, p.151-154.

Costa, L.G., Li W.F., Richte,r R.J., Shih, D.M., Lusis, A., Furlong, C.E. (1999). The role of paraoxonase (PON1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism *Chemico-Biological Interactions.* 119–120: 429 – 438.

Costa, R.P., Meale, M.M.S. (2002). Terapia nutricional oral em cardiologia. In: Waitzberg, D. L. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica, 3ªed., v.1, p.525-542. São Paulo: Atheneu.

Cuen, M.P.S., Bacerra, R. (2003). El achiote, Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Biodiversitas, 7(4): 7-11.

Dabbagh, A J., Mannion, T., Lynch, S.M., Frei, B. (1994). The effect of iron overload on rat plasma and liver oxidant status in vivo. *Biochem.J.,* 300( Pt 3): 799-803.

Dean, B.B., Borenstein, J.E., Henning, J.M., Knight, K., Merz, C.N. (2004). Can change in high-density lipoprotein cholesterol levels reduce cardiovascular risk? *Am.Heart J,.* 147(6): 966-976.

De Oliveira, A. C., Silva, I. B., Manhaes-Rocha, D.A. e Paumgartten, F. J. (2003). Induction of liver monooxygenases by annatto and bixin in female rats. *Braz.J.Med.Biol.Res.,* 36(1): 113-118.

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 de maio de 2005, Ouro Preto, Minas Gerais.

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 de maio de 2005, Ouro Preto, Minas Gerais.

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(6): 1054-1056.

Dueland, S., Drisko, J., Graf, L., Machieder,D., Lusis, A.J., Davis, R.A. (1993). Effect of dietary cholesterol on 7 alpha-hydroxilase and hepatic LDL receptors in inbred mice. *J. Lipid. Res.,* 34: 923-931.

Dufour, D.R., Lott, J.A., Nolte, F.S., Gretch, D.R., Koff, R.S., Seeff, L.B. (2000). Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. I. Performance Characteristics of Laboratory Tests. *Clinical Chemistry,* 46: 2027-2049.

Durrington, P.N., Mackness, B., Mackness, M.I. (2001). Paraoxonase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 21: 473-480.

Fang, Y., Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition,* 18: 872-879.

Faria, L.J.G. Análise experimental do processo de secagem de urucum (B*ixa orellana* L.) em leito fixo. Tese de doutorado em Engenharia Química, FEA/Unicamp, Campinas, (1998) apud SILVA, G. F. Extração de pigmentos de urucum com $CO_2$ supercrítico. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos, Engenharia de Alimentos/FEA/Unicamp, Campinas, 1999.

Felicissimo, M.P., Bittencourt, C., Houssiau, L., Pireaux, J. J. (2004). Time-of-flight econdary ion mass spectrometry and X-ray photoelectron spectroscopy analyses of Bixa orellana seeds. *J.Agric.Food Chem.,* 52(7): 1810-1814.

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.

Ferré, N., Camps, J., Prats. E., Vilella, E., Paul, A., Figuera, L., Joven. J. (2002). Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clinical Chemistry,* 48 (2): 261-268.

Ferreira, S.R.C., Rocha, A.M., Saraiva, J.F.K. (2005). Estatinas na doença renal crônica. *Arq. Bras. Cardiol.***,** 85(5): 45-49.

Fishman, W.H. (1990). Alkaline phosphatase isozymes: recent progress.*Clinical Biochemistry,* 23: 99-104.

Fleischer, T.C., Ameade, E.P.K., Mensah, M.L.K., Sawer, I.K. (2003). Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia,* 74: 136-138.

Fontana, J.D., Mendes, S.V., Persike, D,S., Peracetta, L.F., Passos, M. (2000). Carotenóides. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 13, p 40-45.

Franco, C.F.O. (2006) Mercado de Urucum (*Bixa orellana* L.) no Brasil. Simpósio Brasileiro do Urucum.João Pessoa.

Franco, C.F.O., Silva, F.C.P., Cazé Filho, J., Barreiro Neto, M., José A.R.S., Rebouças T.N.H., Fontinélli, I.S.C. (2006). Etnobotânica e Taxonomia do Urucuzeiro.Simpósio Brasileiro do Urucum. João Pessoa.

Frejaville, J.P. (1989). Manual de exames de laboratório – 500 exames: indicação técnica, interpretação e diagnóstico. Atheneu: Rio de Janeiro, p. 701.

Gent, J., Braakman, I. (2004). Low-density lipoprotein receptor structure and folding. *Cell Mol.Life Sci.,* 61(19-20): 2461-2470.

German, J.B., Dillard, C.J. (2004). Saturated fats: what dietary intake? *Am. J. Clin. Nutr.,* 80(3): 550-559.

Ghiraldini, E. (1994). Corantes naturais mais comumente usados na indústria de alimentos. *Revista Brasileira de Corantes Naturais,* 2(1): 83-87.

Giannini, E.G., Testa, R., Savarino, V. (2005). Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*, 172: 367-379.

Giuliano, G., Rosati, C.E., Bramley, P. M. (2003). To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. *Trends Biotechnol.,* 21(12): 513-516.

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

Goodwin, B., Watson, M.A., Kim, H., Miao, J., Kemper, J.K., Kliewer, S.A. *(*2003). Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor Liver X Receptor α. *Molecular Endocrinology,* **17**: 386-394.

Gonçalves, M.C.R., Diniz, M.F.F.M., Borba, J.D.C., Nunes, X.P., Barbosa-Filho, J.M. (2006). Beringela (Solanum melongena L.) – mito ou realidade no combate as dislipidemias? *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(2): 252-257.

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,* 5(43): 717-724.

Grand-Perret, T., Bouillot, A., Perrot, A. (2001). Scap ligands are potent new lipid-lowering drugs. *Nat Med.,* **7**: 1332-1338.

Grone, E. F., Walli, A. K., Grone, H. J., Miller, B., Seidel, D. (1994). The role of lipids in nephrosclerosis and glomerulosclerosis. *Atherosclerosis,* 10**7**(1): 1-13.

Gruendel, S., Garcia, A.L., Otto, B., Mueller, C., Steiniger, J., Weickert, M.O., Speth, M., Katz, N., Koebnick, C. (2006). Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fiber and polyphenols enhances lipid xidation and lowers postprandial acylated ghrelin in humans. *J. Nutr.,* 136: 1533-1538.

Gupta, S., Pandak, W.M., Hylemona, P.B. (2002). LXRα is the dominant regulator of CYP7A1 transcription. *Biochemical Biophysical Research,* 293: 338-343.

Hagiwara, A., Imai, N., Ichihara, T., Sano, M., Tamano, S., Aoki, H., Yasuhara, K.,Koda, T., Nakamura, M., Shirai, T. (2003). A thirteen-week oral toxicity study of annatto extract (norbixin), a natural food color extracted from the seed coat of annatto (Bixa orellana L.), in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology,* 41: 1157-1164.

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

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1999). Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, Oxford.

Harbone, J. B.(1975). Flavonoids bisulphates and their co-occurrences with elagic acid in the *Bixaceae, Frankeniacea* and related families.*Phytochemistry,*14 (3): 1331-1337.

Hasmeda, M., Polya, G.M. (1995). Inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by curcumin. *Phytochemistry* 42(11), 599-605.

Hattori, M., Nikolic-Paterson, D.J., Miyazaki, K., Isbel, N.M., Lan, H.Y., Atkin, R.C., Kawaguchi, H., Ito, K. (1999). Mechanisms of glomerular macrophage infiltration in lipid-induced renal injury. *Kidney Int., Suppl.,* 71: S47-S50.

Health Canada (1997). Policy Options Analysis: Nutraceuticals/Functional Foods. Ottawa: Health Canada, Health Protection Branch, Therapeutic Products Programme and Food Directorate.

Hegele, R.A. (2009). Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nature*, 10: 109-121.

Hempenius, R.A., Van Delft, J.M.H., Prinsen, M., Lina, B.A.R. (1997). Preliminary safety assessment of an arachidonic acid-enriched oil derived from Mortierella alpina: summary of toxicological data. *Food and Chemical Toxicology,* 35: 573-581.

Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, P.C. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly study. *Lancet.,* 342: 1007-1011.

Hilliam, M. (2000). Functional food- How big is the market? *The World of Food Ingredients,* 12: 50-52.

Horton, J. D., Cuthbert, J.A., Spady, D.K. (1995). Regulation of hepatic 7α-hydroxilase expression and response to dietary cholesterol in the rat and hamster. *J. Biolog. Chem.,* 270(10): 5381-5387.

Hsu, P.K., Chien, P.J., Chen, C.H., Chau, C.F. (2006). Carrot insoluble fiber-rich fraction lowers lipid and cholesterol absorption in hamsters. *LWT - Food Science and Technology,* 39: 338-343.

Hussein, O., Frydman, G., Frim, H., Aviram, M. (2001). Reduced susceptibility of low density lipoprotein to lipid peroxidation after cholestyramine treatment in heterozygous familial hypercholesterolemic children. *Pathophysiology,* 8(1): 21-28.

Ishiyama, A., Atarashi, K., Minami, M., Takagi, M., Kimura, K., Goto, A., Omata, M. (1999). Role of free radicals in the pathogenesis of lipid-induced glomerulosclerosis in rats. *Kidney International*, 55(4): 1348-1358.

Jahromi, F., Ray, A.B., Chansouria, J.P.N. (1993). Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Pterocarpus marsupium*. *Journal of Natural Products,* 56:989-994.

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 N°. 683.

Joles, J.A., Kunter, U., Janssen, U., Kriz, W., Rabelink, T. J., Koomans, H. A., Floege, J. (2000). Early mechanisms of renal injury in hypercholesterolemic or hypertriglyceridemic rats. *J. Am. Soc. Nephrol.,* 11: 669-683.

Jonnalagadda, S.S., Thye, F.W., Robertson, J.L. (1993). Plasma total and lipoprotein cholesterol, liver cholesterol and fecal cholesterol excretion in hamsters fed fiber diets. *J. Nutr.,* 123: 1377-1382.

Jordão Jr., A. A., Chiarello, P. G., Bernardes, M. S. M.,vannucchi, H. (1998). Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutationa reduzida e da vitamna E. *Medicina, Ribeirão Preto,* 31**:** 434-449.

Jorge, P.A.R. (1997). Endotélio, lípides e aterosclerose. *Arq. Bras. Cardiol.,* 68(2): 129-134.

Jorge, P.A.R., Neyra, L.C., Osaki, R.M., Almeida E.D., Bragagnolo, N. (1998). Efeito da berinjela sobre os lípides plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia experimental. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia,* 70: 87-91.

Kaliora, A.C., Dedoussis, G.V.Z., Schmidt, H. (2005). Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis,* 18: 1-17.

Kamanna, V.S., Roh, D.D., Kirschenbaum, M.A. (2000). Hyperlidemia and kidney disease: concepts derived from histopatollogy and cell biology of the glomerulus. *Nephrology,* 1: 358-364.

Kasiske, B.L., O'Donnell, M.D., Cleary, M.P., Keane, W.F. (1988). Treatment of hyperlipidemia reduces glomerular injury in obese Zucker rats. *Kidney Int.*, 33: 667-672. In: Abrass, C.K. (2004). Cellular Lipid Metabolism and the Role of Lipids in Progressive Renal Disease. *Am. J. Nephrol.,* 24: 46-53.

Kees-Folts, D., Diamond, J.R. (1993). Relationship between hyperlipidemia, lipid mediators, and progressive glomerulosclerosis in the nephritic syndrome. *Am. J. Nephrol.,* 13: 365-375.

Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B,. Kanner, J. (1993). Possible mechanism for the protective role of the antioxidant in wine and plant foods. *Food Technology,* 47: 85-89.

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

Kritchevsky, S.B., Shimakawa, T., Tell, G.S., Dennis, B., Carpenter, M.S. (1995). Dietary antioxidants and carotid artery wall thickness. The ARIC study. Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circulation,* 92: 2142-2150.

Kritchevsky, S.B. (1999). β-Carotene, Carotenoids and the Prevention of Coronary Heart Disease. *J. Nutr.,* 129: 5-8.

Kroes, R., Schaefer, E.J., Squire, R.A., Williams, G.M. (2003). A review of the safety of DHA45-oil. *Food and Chemical Toxicology,* 41: 1433-1446.

Lai, L. S., Chou, S.T.E., Chao,W.W. (2001). Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsao (Mesona procumbens Hemsl) leaf gum. *J. Agric. Food Chem.,* 49(2): 963-968.

Lehninger, A.L. Princípios de Bioquímica: (1995). São Paulo: Sarvier, p. 839.

Lima, A.O., Soares, J.B., Greco, J.B., Galizzi, J., Cançado, J.R. (1985). Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica – Técnica e Interpretação, 6ª ed., Guanabara Koogan.

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.,* 38:(4):196-200.

Lima, L. R. P., Oliveira, T. T., Nagem, T.J. (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. (2001). Efeitos farmacológico, toxicológico e mecanismo de ação dos flavonóides e corantes naturais extraídos do urucum (Bixa orelha L.) no metabolismo lipídico de coelhos. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Lina, B.A.R., Wolterbeek, A.P.M., Suwa, Y., Fujikawa, S., Ishikura, Y., Tsuda, S., Dohnalek, M. (2006). Subchronic (13-week) oral toxicity study, preceded by an in utero exposure phase, with arachidonate-enriched triglyceride oil (SUNTGA40S) in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 326-335.

Lopez, D., Ness, G.C. (1997). Inhibitors of 3-hydroxi-3methylglutaril coenzyme A reductase unmask transcriptional regulation on hepatic low-density lipoprotein receptor gene expression by dietary cholesterol. *Arch. Biochem. Biophys.,* 344: 215-219. In: Ness, C.N., Chambers, C.M. (2000). Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: The concept of cholesterol buffering capacity. *P.S.E.M.B.* 224: 8-19.

Luduving, M.M. (1997). Conheça os inimigos do colesterol. In: Saúde! É vital. São Paulo, Azul, p. 169.

Lyng, S.M.O., Passos, M., Fontana, J.D. (2005). Bixin and α-cyclodextrin inclusion complex and stability tests. *Process Biochemistry,* 40: 865–872.

Maciel, A.M. (2008). Defesas antioxidantes e perfil sérico de lipídios em hamsteres (*mesocricetus auratus*) tratados com torta de bixina. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais.

Margarson, M.P., Soni, N. (1998). Serum albumin: touchstone or totem? *Anaesthesia,* 53: 789-803.

Mazzoco, A., Torres, B.B.(1999). Bioquímica Básica, p. 360. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

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

Matos, S. L. (2002). Avaliação de modelos dietéticos para o estudo de hipercolesterolemia em ratos. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais.

Matos, S.L., de Paula, H., Pedrosa, M.L., Santos, R.C., Oliveira, E.L., Chianca Júnior, D.A., Silva, M.E. (2005). Dietary models for inducing hypercholesterolemia in rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology,* 48: 203-209.

May, P.H., Rocha, R.B., Silva, O.P., Wagner, P.D., Silbeerling, L. (1997). Management of Commodity Resource in the Context of Sustainable Development - A Survey of Environmentally Friendly Products of Brazil. United conference on trade and development, v.8, p.33-36.

Menaker, L., Navia, J.M. (1973). Appetite regulation in the rat under various physiological conditions: the role of dietary protein and calories1. *J. Nutr.*, 103: 347-352.

Mercadante, A.Z., Steck, A., Rodriguez-Amaya, D., Pfander, H., Britton, G. (1996) Isolation of methyl 9'Z-apo-6'-lycopenoate from Bixa orellana. *Phytochemistry,* 41:1201-1203.

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.

Moraes, F.P. e Colla, L.M. (2006). Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia,* 3(2): 109-122.

Moss, D.W. (1997). Physicochemical and pathophysiological factors in the release of membrane-bound alkaline phosphatase from cells. *Clinica Chimica Acta,* 257: 133-140.

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., Starnes, B. W. (2005). Atherosclerosis as inflammation. *Annals of Vascular Surgery,* Detroit, 9:30-138.

Muzandu, K., Ishizuka, M., Sakamoto, K. Q., Shaban, Z., Bohi, K.E., Kazusaka, A., Shoichi F.S. (2006). Effect of lycopene and β-carotene on peroxynitrite-mediated cellular modifications. *Toxicology Applied Pharmacology,* 215: 330-340.

Najar, S.V., Bobbio, F.O., Bobbio, P. (1988). Effects of ligth, air, anti-oxidants and pro-oxidants on Annatto extracts (*Bixa orellana*). *Food Chemistry,* 29(4): 283-289.

Neto, F.T. (2003). Nutrição Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.21-22 e 147.

Neves, N.M.S. (1997). Nutrição e doença cardiovascular**.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.109.

Nicholson, J.P., Wolmarans, M.R., Park, G.R. (2000). The role of albumin in critical illness. *Br. J. Anaesth.,* 85: 599-610.

Nielsen ,M.R. (1990). Natural colors for ice-cream. *Scandinavian Dairy Information,* 4(4): 56-58.

Niki, E. (2004). Antioxidants and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions,* 32:156-159.

Nogueira, G.V., Silveira, L., Martin, A.A., Zangaro, R.A., Pacheco, M.T., Chavantes, M.C., Pasqualucci, C.A. (2005). Raman spectroscopy study of atherosclerosis in human carotid artery. *J. Biomed. Opt.,* 10: 031117.

Ohama, H., Ikeda, H., Moriyama, H. (2006). Health foods and foods with health claims in Japan. *Toxicology*, 221: 95-111.

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.

Olson, R. E. (1998). Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J.Nutr.* 128(2 Suppl), 439S-443S.

Oram, J.F. (2002). Molecular basis of cholesterol homeostasis: lessons from Tangier disease and ABCA1. *Trends Mol. Med.,* 8(4):168-173.

Oram, J.F., Vaughan, A.M. (2006). ATP-binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ. Res.,* 99: 1031-1043.

Park, Y.K., Koo, M.H., Carvalho, P.D.O. (1997). Recentes progressos dos alimentos funcionais. *Boletim da SBCTA,*31:200-206.

Paumgartten, F.J.R., De-Carvalho, R.R., Araujo, I.B., Pinto, F.M., Borges, O.O., Souza, C.A.M., Kuriyama, S.N. (2002). Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. *Food Chem. Toxicol.,* 40: 1595–1601.

Pedrosa, V.A., Caetano, J., Machado, S.A.S., Bertotti, M. (2008). Determination of Parathion and Carbaryl Pesticides in Water and Food Samples Using a Self Assembled Monolayer /Acetylcholinesterase Electrochemical Biosensor. *Sensors., 8*: 4600-4610; DOI: 10.3390/s8084600.

Pereira, W. L., Oliveira, T. T, Nagem, T. J., Pinto, A. S., Stringheta, P. C., Oliveira, M. G. A.(1999).Redução nos níveis de lipídeos utilizando o flavonóide biochanina A e os corantes monascus e clorofila. *Revista Brasileira de Corantes Naturais,* 3(3): 59-65.

Peters, T. (1977). Serum albumin: Recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. *Clin. Chem.,* 23: 5-12.

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

Pimentel, C.V.M.B., francki, V.M., Gollucke, A.P.B. (2005). Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. Ed. Varela. p.95.

Preston, H.D. e Rickard, M.D. (1980). Extraction and chemistry of annatto. *Food Chemistry,* 5(1): 47-56.

Princen, J.M.G., Mal-Basks, G.R.B., Yap, S.H. (1983). Restoration effects of glucose refeeding on reduced synthesis of albumin and total protein on disaggregated poliribosomes in liver of starved rats: evidence of post-transcripitional control mechanism. *Am Nutr. Metab.,* 27: 182-193. In: Santos, N.S.J., Draibe, S.A., Kamimura, M.A., Cuppari. (2004). Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. *Rev. Nutri.,* 17(3): 339-349.

Rao, D. S., Sekhara, N. C., Satyanarayana, M. N., Srinivasan, M. (1970), Effect of curcumin on serum and liver cholesterol levels in the rat. *J.Nutr*. 100(11): 1307-1315.

Raupp, D.S. (1994).Caracterização nutricional da fibra alimentar solúvel e insolúvel do feijão "carioca 80 SH" em dietas experimentais com ratos. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

Reddy, M.K., Alexander-Lindo, R.L., Nair, M.G. (2005), Relative Inhibition of Lipid Peroxidation, Cyclooxygenase Enzymes, and Human Tumor Cell Proliferation by Natural Food Colors. *J. Agric. Food Chem*., **53**, 9268-9273.

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., 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.

Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J. (2000). The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.,* 16: 459-81.

Ribas, V., Sanchez-Quesada, J.L., Anton, R. (2004). Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. *Circ. Res.,* 95: 789-797.

Ribeiro, K.C., Shintaku, R.C.O. (2004). A influência dos lipídios da dieta sobre a aterosclerose. *ConScientia e Saúde,* 3:73-83. São Paulo:UNINOVE.

Richter, R.J., Jarvik, G.P., Furlong. C.E. (2009). Paraoxonase 1 (PON1) status and substrate hydrolysis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 235:1–9.

Rivera-Madrid, R., Escobedo-GM, R.M., Balam-Galera, E., Vera-Ku, M., Harries, H. (2006). Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (Bixa orellana L.). *Scientia Horticulturae,* 109: 165-172.

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

Rodríguez, M.B.S., Megías, S.M., Baena, B.M. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿cerca o lejos? *Ver. Esp. Salud Pública,* 77: 317-331.

Rosa, O.B.C., Costa, N.M.B., Nunes, R.M., Leal, P.F.G. (1998). Efeito dos feijões (*Phaseolus vulgaris*) preto, carioquinha e vermelho na redução do colesterol de ratos hipercolesterolêmicos. *Archivos Latino Americanos Nutrição,*. 43(4): 306-310.

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, Minas Gerais.

Rossoni Jr., J.V. (2008). Perfil lipídico, defesas antioxidantes e marcadores de função hepática e renal em hamsteres tratados com extratos de sementes de urucum. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais.

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

Sanders, M.E. (1998). Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *Int. Dairy Journal,* 8: 341-347.

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.; Caramelli, 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,* 77:1-48.

Scott. J. (2004). Pathophysiology and biochemistry of cariodiovascular disease. *Current Opnion in Genetics & Developmet,*14: 271-279.

Sedlak, J., Lindsay, R.H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry.* 25: 192-205.

Shami, N.J.I.E., Moreira, E.A.M. (2004). Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição,* 17(2): 227-236.

Shih, D. M., Gu, L., Hama, S., Xia, Y. R., Navab, M., Fogelman, A. M., 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, D. M., Xia, Y. R., Wang, X.P., Miller, E., Castellani, L.W., Subbanagounder, G., Cheroutre, H., Faull, K.F., Berliner, J.A., Witztum, J.L., Lusis A. J. (2000). Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein e knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *The Journal of Biological Chemistry,* 275(23): 17527–17535.

Shilpi, J.A., Taufiq-Ur-Rahman, Uddin, S.J., Shahanur, A., Sadhu, S.K., Véronique, S. (2006). Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. *Journal of Ethnopharmacology,* 108: 264-271.

Shuhama, I.K., Aguiar, M.L., Oliveira, W.P., Freitas, L.A.P. (2003). Experimental production of annatto powders in spouted bed dryer. *Journal of Food Engineering,* 59: 93-97.

Shurpalekar, K.S. Doraiswamy, T.R., Sundaravalli, O.E., Narayana Rao, M. (1971). Effect of inclusion of cellulose in 'atherogenic' diet on the blood lipids of children. *Nature,* 232: 554-555.

Silva, C. R., Antunes, L.M.G., Bianchi, M. L. (2001). Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol. Res.,* 43(6): 561-566.

Smith, B., Marcotte, M., Harman, G. (2008). A Comparative Analysis of the Regulatory Framework Affecting Functional Food Development and Commercialization in Canada, Japan, the European Union and the United States of America. Ottawa: Intersector Alliance

Sociedade Brasileira de Cardiologia. (1996). Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias: Detecção-Avaliação-Tratamento. *Arq. Bras. Cardiol.,* 67: 113-128.

Souza, E.C.G. (2001). Efeitos de bixina sobre os parâmetros bioquímicos séricos em ratos. 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.Turley, S. D.; Dietschy, J. M. (1985). Rates of low density lipoprotein uptake and cholesterol synthesis are regulated independently in the liver. *J. Lipid. Res.,* 26:465 – 472.

Stahl W., Sies, H. (1996). Lycopene: a biological important carotenoid for humans? *Arch. Bichem. Biophys.,* 331: 1-9.

Stephens, N G., Parsons, A., Schofield, P.M. (1996). Randomised controlled trial of Vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet.,* 347: 781-786.

Stocker, R. e Keaney JR, J. F. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.,* 84(4): 1381-1478.

Story, A. J., Baldino, A. (1981). Modification of cholesterol accumulation by dietary fiber in rats. *Nutrition Reports International,* 24: 1213-1217.

Suresh Babu, P.S., Srinivasan, K. (1997). Hipolipidemic action of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in streptozotocin induced diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry,* 166: 169-175.

Tang, J., Srivastava, R.A.K., Krul, E.S., Baumann, D., Pfleger, B.B., Kitchens, R.T., Schonfeld, G. (1991). In vivo regulation of apolipoproteína A-I gene expression by estradiol and testosterone occurs by different mechanisms in inbred strains of mice. J. Lpid. Res., 32: 1571-1585.

Thomás-Moyá, E., Gianotti, M., Lladó, I., Proenza, A.M. (2006). Effects of caloric restriction and gender on rat serum paraoxonase 1 activity. *Journal of Nutritional Biochemistry,* 17: 197-203.

Thomás-Moyá, E., Gianotti, M., Proenza, A.M., Lladó, I. (2007). Paraoxonase 1 response to a high-fat diet: Gender differences in the factors involved. *Mol. Med,.* 13(3-4): 203-209.

Trautwein, E.A., Jurgensen, U., Erbersdobler, H.F. (1997). Cholesterol-lowering and gallstone-preventing action of chitosans with different degrees of deacetylation in hamsters fed cholesterol-rich diets. Nutr Res 17:1053–1065.

Van Bennekum, A.M., Nguyen, D.V., Schulthess, G., Hauser, H., Philips, C. (2005). Mechanisms of cholesterol-lowering effects of dietary fibres: relationships with intestinal and hepatic parameters. *British Journal of Nutrition,* 94: 331-337.

Van Vlijmen, B.J.M., Van't Hof, H.B., Mol, M.J.T.M., Van der Zee, A., Frantes, R.R., Hofker, M.H.Havekes, L.M. (1996). Modulation of very low density lipoprotein production and clearance contributes to age and gender dependent hyperlipoproteinemia in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice. *J. Clin.Invest.,* 97(5): 1184-1192.

Vannucchi, H., Marchini, J.S. (2007). Nutrição e Metabolismo -Nutrição Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.38.

Varma, S. D. Inhibition of aldose reductase by flavonoids: Possible attenuation of diabetic complications. In: Cody, V., Middleton, Jr. E., Harborne, J. B. (1986). Plant flavonoids in biology and medicine. *New York: Alan R. Liss*, 213: 343-358.

Velayudham, L.S., Farrell, G.C. (2003). Drug-induced cholestasis. *Expert Opinion on Drug Safety,* 2: 287-304.

Verschuren, P.M. (2002). Functional foods: scientific and global perspectives. *British Journal of Nutrition,* 88, Suppl 2: S125-S130.

Vieira, E.C. (2003). Functional foods. *Rev. Med. Minas Gerais,* 13(4): 260-262.

Watson, A.D., Berliner, J.A., Hama, S.Y. (1995). Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.,* 96: 2882-2891.

Weber, L.W., Boll, M., Stampfl, A. (2004). Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. *World J.Gastroenterol.,* 10(21): 3081-3087.

Weststrate, J.A., van Poppel, G., Verschuren, P.M. (2002). Functional foods, trends and future. *British Journal of Nutrition,* 88, Suppl 2: S233-S235.

Wheeler, D.C., Bernard, D.B. (1994). Lipid abnormalities in the nephrotic syndrome: causes, consequences and treatment. Am J. Kidney Dis., 23: 331-346. In: Majumdar, A., Wheeler, D.C. (2000). Lipid abnormalities in renal disease. *J. Soc. Med.,* 93: 178-182.

Wilson, T.A., Romano, C., Liang, J., Nicolosi, R.J. (1998). The hypocholesterolemic and antiatherogenic effects of Cholazol H, a chemically functionalized insoluble fiber with bile acid sequestrant properties in hamsters. *Metabolism,* 47(8): 959-64.

Wisdom, S., Wilson, K., Mckillop, J.H., Walker, J.J. (1991). Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *American Journal of obstetrics and ginecology,* 165: 170-174.

Wolters, H., Elzinga, B. M., Baller, J. F., Boverhof, R., Schwarz, M., Stieger, B., Verkade, H. J., 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.

World Cancer Research Fund. (1997). Food, Nutrition and Prevention of Cancer: A global perspective. *American Institure for Cancer Research,* p.670, Washington, DC.

Xavier, H. T., Abdalla, D. S. P., Martinez, T. L. R., Ramirez, J. A. F., 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,* .83:493-497.

Xu, G.; Salen, G.; Shefer, S.; Ness, G. C.; Nguyen, L,B.; Parker, T. S. Chen, T. S.; Zhao, Z.; Donnelly, T. M.; Tint, G. S. (1995) Unexpected inhibition of cholesterol -7 α-hydroxylase by cholesterol in New Zealand white and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J. Clin. Invest.,* 95:1497–1504.

Zamora, R., Hidalgo, F.J., Tappel, A.L. (1991). Comparative antioxidant effectiveness of dietary b-carotene, vitamin E, selenium and coenzyme Q10 in rat erythrocytes and plasma. *J. Nutr.* 121: 50-56.

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.

Zunft, H.J., Lueder, W., Harde, A., Haber, B., GraubaumM H.J., Gruenwald, J. (2001). Carob pulp preparation for treatment of hypercholesterolemia. *Adv. Ther.,* 18: 230-236.
Zunft, H.J.F, Lüder, W., Harde, A., Haber, B., Graubaum, H. J., Koebnick, C., Grünwald, J. (2003). Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients. *Eur. J. Nutr.,* 42: 235-242.

# ANEXOS

## Anexo I - Laudo de análise do produto extrato oleoso de bixina P.A. Lipo 8%

## Anexo II – Protocolos das Dosagens Bioquímicas

### *Albumina*

**Princípio**
A albumina interage com o verde de bromocresol tamponado e, devido ao erro protéico dos indicadores, ocorre formação de cor verde, proporcional à concentração da albumina na amostra. O verde de bromocresol possui especificidade para albumina e não sofre interferência de valores elevados de bilirrubina e hemoglobina, permitindo também que as interferências de valores elevados de triglicérides possam ser corrigidas utilizando o branco de amostra.

**Amostra**
Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro. Não usar plasma. O analito é estável por 3 dias entre 2 – 8°C e 7 dias a 10ºC negativos.

**Produto Utilizado**
Albumina, Catálogo 19 - ANVISA – 10009010025
Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000
Reagente de Cor: Armazenar entre 2 – 8 ºC. Contém tampão 60 mmol/L, pH3,8, verde de bromocresol 300 μmol/L e Brij 35 ≥ 6,0 mmol/L.
Padrão - 3,8 g/dL: Armazenar entre 2 – 8 ºC bem vedado para evitar evaporação. Contém azida sódica 15,4 mmol/L.

**Equipamentos**
1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 630 nm ou filtro vermelho (600 a 640 nm).
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

**Procedimento**
Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

| | Branco | Teste | Padrão |
|---|---|---|---|
| Reagente de Cor (nº 1) | 1,0 mL | 1,0 mL | 1,0 mL |
| Soro | ----- | 0,01 mL | ----- |
| Padrão (nº 2) | ----- | ----- | 0,01 mL |

Misturar e após 2 minutos, no máximo 10 minutos, determinar as absorbâncias do teste e padrão em 630 nm ou filtro vermelho (600 a 640 nm), acertando o zero com o branco.

**Cálculos**

Albumina (g/dL) = $\frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 3{,}8$

Conversão de g/dL para Unidade SI: µmol/L = g/dL x 144,9
O resultado da medição é linear até 6,0 g/dL. Para valores maiores diluir o soro com NaCI 150 mmol/L e repetir a determinação. Multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição. Diluir o soro de tal modo que o valor encontrado se situe entre 3,0 e 4,5 g/dL.

***Alanina Aminotransferase***

**Princípio**

A ALT catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. Este é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A conseqüente redução da absorbância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

L-Alanina + Cetoglutarato $\xrightarrow{ALT}$ Piruvato + L-Glutamato

Piruvato + NADH $\xrightarrow{LDH}$ L-Lactato + NAD

**Amostra**
Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (EDTA, heparina). A atividade enzimática é estável por 4 dias entre 2 – 8 ºC e por 2 semanas a 10 ºC negativos.

**Produto Utilizado**
ALT/GPT Liquiform, Catálogo 74-4/30 - ANVISA - 10009010029
Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000
Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C.
Reagente 2: Armazenar entre 2 – 8°C.
Reagente de Trabalho: O conjunto de um frasco de Reagente 1 e de um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Estável por 5 dias entre 15 - 25 ºC e 14 dias entre 2 – 8°C. Contém tampão 80 mmol/L, pH 7,8, L-Alanina 500 mmol/L, 2-cetoglutarato 15 mmo/L, NADH 180

**Equipamentos**
1. Fotômetro com cubeta termostatizada a 37 ºC capaz de medir a absorbância em 340 ou 365 nm com exatidão.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

**Procedimento**

Condições de Reação: comprimento de onda de 340 ou 365 nm; cubeta termostatizada a 37ºC com 10 mm de espessura de solução; banda de passagem de 8 nm ou menos e luz espúria menor que 0,1%.

1. Adicionar 0,1 mL de amostra a 1,0 mL do Reagente de Trabalho.
2. Homogeneizar.
3. Transferir para a cubeta termostatizada a 37 ºC.
4. Esperar 1 minuto.
5. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro.
6. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

**Cálculos**

Calcular a média das diferenças de absorbância por minuto (ΔA/minuto) e utilizar para calcular o resultado.

ALT/GPT (U/L) 340 nm = Δ A/minuto x 1746

Conversão: Unidades Convencionais (U/L) x 16,7 = Unidades SI (nkat/L).

***Aspartato Aminotransferase***

**Princípio**

A AST catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD.

A conseqüente redução da absorbância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

$$\text{L-Aspartato} + \text{Cetoglutarato} \xrightarrow{AST} \text{Oxalacetato} + \text{L-Glutamato}$$

$$\text{Oxalacetato} + \text{NADH} \xrightarrow{MDH} \text{L-Malato} + \text{NAD}$$

**Amostra**

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (EDTA, heparina). A atividade enzimática é estável por 4 dias entre 2 – 8°C e por 2 semanas a 10°C negativos.

**Produto Utilizado**

AST/GOT Liquiform, Catálogo 75-4/30 - ANVISA - 10009010018

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente 2: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente de Trabalho: o conjunto de um frasco de Reagente 1 e de um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Estável por 5 dias entre 15 – 25°C e por 14 dias entre 2 – 8°C; Contém tampão 80 mmol/L,pH 7,8,L-Aspartato 240 mmol/L, 2-cetoglutarato 12 mmo/l,NADH 180 µmol/l,LDH ≥900 U/L, MDH ≥600 U/L e azida sódica 14,6 mmol/L.

**Equipamentos**

1. Fotômetro com cubeta termostatizada a 37 ºC capaz de medir a absorbância em 340 ou 365 nm com exatidão.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

**Procedimento**

Condições de Reação: comprimento de onda de 340 ou 365 nm; cubeta termostatizada a 37ºC com 10 mm de espessura de solução; banda de passagem de 8 nm ou menos e luz espúria menor que 0,1%.

1. Adicionar 0,1 mL de amostra a 1,0 mL do reagente de trabalho.
2. Homogeneizar.
3. Transferir para a cubeta termostatizada a 37 ºC.
4. Esperar 1 minuto.
5. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro.
6. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

**Cálculos**

Calcular a média das diferenças de absorbância por minuto (ΔA/minuto) e utilizar para calcular o resultado.

AST/GOT (U/L) 340 nm = Δ A/minuto x 1746

Conversão: Unidades Convencionais (U/L) x 16,7 = Unidades SI (nkat/L).

***Colesterol HDL***

**Princípio**

As lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (Colesterol HDL) é determinado no sobrenadante.

**Amostra**

O jejum não é imprescindível para a dosagem de colesterol HDL. Usar soro. O analito é estável por 3 dias entre 2 – 8ºC.

**Produto Utilizado**

Colesterol HDL, Catálogo 13 - ANVISA – 10009010026

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Precipitante: Armazenar entre 2 – 8°C. Contém ácido fosfotúngstico 1,5 mmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L.

Padrão - 20 mg/dL: Armazenar entre 2 – 8°C. Armazenar bem vedado para evitar evaporação.

**Equipamentos**

1. Centrífuga para tubos.
2. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm).
3. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 ºC).
4. Pipetas para medir amostras e reagentes.
5. Cronômetro.

**Procedimento**

Precipitação das VLDL e LDL

Em um tubo 12 x 75 colocar 0,25mL de soro e 0,25mL de precipitante. Agitar vigorosamente durante 30 segundos. A agitação sugerida é fundamental para obtenção de resultados consistentes. Centrifugar a 3.500 rpm por pelo menos 15 minutos para obter um sobrenadante límpido. Pipetar o sobrenadante límpido imediatamente após a centrifugação, tomando o cuidado para não ressuspender o precipitado, a fim de evitar resultados falsamente elevados.

Utilizar com o Reagente 1 - Colesterol Liquiform Labtest Cat. 76. Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

| | Branco | Teste | Padrão |
|---|---|---|---|
| Sobrenadante | ----- | 0,1 mL | ----- |
| Padrão (nº 2) | ----- | ----- | 0,1 mL |
| Reagente 1 | 1,0 mL | 1,0 mL | 1,0 mL |

Misturar e colocar no banho-maria a 37 ºC durante 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 540 nm) acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

***Cálculos***

$$\text{HDL mg/dL} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 40$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,026

***Colesterol Total***

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

Ésteres de colesterol $\xrightarrow{\text{Colesterol Esterase}}$ Colesterol + Ácidos graxos
Colesterol + $O_2$ $\xrightarrow{\text{Colesterol Oxidase}}$ Colest-4-en-ona + $H_2O_2$
$2H_2O_2$ + Fenol + 4-Aminoantipirina $\xrightarrow{\text{Peroxidase}}$ Antipirilquinonimina + $4H_2O$
A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra.

**Amostra**
O jejum não é imprescindível para a dosagem de colesterol total. Usar soro. Anticoagulantes como citrato, oxalato ou EDTA produzem resultados falsamente diminuídos. O analito é estável por 7 dias entre 2 – 8 ºC e vários meses a 10 ºC negativos.

**Produto Utilizado**
Colesterol Liquiform, Catálogo 76-2/100 - ANVISA - 10009010068
Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000
Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C. Contém tampão 50 mmol, pH 7,0, fenol 24,0 mmol/L, colato de sódio 500 µmol/L, azida sódica 15 mmol/L, 4 aminoantipirina 500 µmol/L, colesterol esterase ≥250 U/L, colesterol oxidase ≥250 U/L e peroxidase ≥1000 U/L.
Padrão 200 mg/dL: Armazenar entre 2 – 8°C. Após o manuseio armazenar bem vedado para evitar evaporação. Contém azida sódica 15 mmol/L.

**Equipamentos**
1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 ºC).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

**Procedimento**
Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

| | Branco | Teste | Padrão |
|---|---|---|---|
| Amostra | ----- | 0,01 mL | ----- |
| Padrão (nº 2) | ----- | ----- | 0,01 mL |
| Reagente 1 | 1,0 mL | 1,0 mL | 1,0 mL |

Misturar e colocar em banho-maria 37 ºC 10 minutos. O nível de água no banho deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

**Cálculos**

Colesterol mg/dL= $\frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,026

***Creatinina***

**Princípio**

O método se baseia na observação de que a reação da creatinina com o picrato alcalino é muito rápida, enquanto a reação do picrato com os cromogênios é mais lenta. A medida da reação nos primeiros minutos permite a determinação da creatinina verdadeira.
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.
Creatinina + Ácido Pícrico → Picrato de Creatinina

**Amostra**

Para creatinina sérica recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Soro ou plasma (heparina, EDTA, fluoreto, oxalato, citrato). O anticoagulante Glistab (Labtest Cat. 29) permite a colheita de uma só amostra para as dosagens de creatinina, glicose e uréia. O analito é estável por 7 dias entre 2 – 8°C.

**Produto Utilizado**

Creatinina K, Catálogo 96 - ANVISA - 10009010143
Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000
NaOH: Armazenar entre 15 – 30°C. Contém hidróxido de sódio 200 mmol/L.
Ácido Pícrico: Armazenar entre 15 – 30°C. Contém ácido pícrico 22,2 mmol/L.
Padrão - 4,0 mg/dL: Armazenar entre 2 – 30°C. Após o manuseio, sugere-se armazenar bem vedado para evitar evaporação.
Ferricianeto: Armazenar entre 15 – 30 ºC. Contém ferricianeto de potássio 11 mmol/L.

**Equipamentos**

1. Fotômetro com cubeta termostatizada capaz de medir com exatidão a absorbância em 510 nm.
2. Pipetas para medir amostras e reagente.
3. Cronômetro.

**Procedimento**

Preparo do picrato alcalino: Misturar 4 volumes de NaOH (nº 1) com 1 volume de Ácido Pícrico (nº 2). Estável 15 dias entre 2 - 8 ºC. O $CO_2$ atmosférico altera significativamente a estabilidade do NaOH (No. 1) e do Picrato Alcalino, quando os reagentes são mantidos em recipientes abertos. A modificação da estabilidade é influenciada pelo tempo de exposição e condições ambientais. Sugerimos manter na

bandeja do analisador somente o volume suficiente para a realização de uma corrida analítica ou usar as informações do controle da qualidade como indicador da necessidade de realizar nova calibração.
Procedimento: Ajustar o fotômetro a zero em 510 nm com água destilada. Adicionar 0,1 mL de padrão, soro, plasma ou urina diluída a 1,0 mL do Picrato Alcalino. Misturar e aspirar imediatamente para a cubeta. Disparar um cronômetro e medir as absorbâncias aos 30 e 90 segundos.

**Cálculos**
ΔA do Teste ou Padrão = Abs 90 segundos – Abs 30 segundos

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = \frac{\Delta\,\text{Absorbância do Teste}}{\Delta\,\text{Absorbância do padrão}} \times 4$$

***Fosfatase Alcalina***

**Princípio**
A fosfatase alcalina (FALC) do soro, em pH alcalino, hidrolisa o p-nitrofenilfosfato, liberando p-nitrofenol e fosfato inorgânico de acordo com a seguinte reação:

$$\text{p-nitrofenilfosfato} + H_2O \xrightarrow{ALP} \text{p-nitrofenol} + \text{fosfato}$$

A quantidade de p-nitrofenol produzida tem elevada absorbância em 405 nm e é diretamente proporcional à atividade da fosfatase alcalina na amostra.

**Amostra**
Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Soro ou plasma (heparina). A amostra é estável por 7 dias entre 2 – 8°C. Quando a amostra é armazenada à temperatura ambiente, obtêm-se resultados falsamente elevados.

**Produto Utilizado**
Fosfatase Alcalina Liquiform, Catálogo 74-4/30 - ANVISA - 10009010050
Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000
Reagente 1: Armazenar entre 2 - 8 ºC.
Reagente 2: Armazenar entre 2 - 8 ºC.
Reagente de Trabalho: o conjunto de um frasco de Reagente 1 e de um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Estável 5 dias entre 15 – 25°C e 30 dias entre 2 – 8°C. Contém tampão 350 mmol/L pH 10,4, sulfato de zinco 1,0 mmol/L, acetato de magnésio 2,0 mmol/L p-nitrofenilfosfato ≥12 mmol/L, azida sódica 6,4 mmol/L.

**Equipamentos**
1. Fotômetro com cubeta termostatizada capaz de medir com exatidão a absorbância em 405 nm.
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
3. Pipetas para medir amostras e reagente.
4. Cronômetro.

**Procedimento**

Condições de Reação: comprimento de onda de 405 ± 2 nm, cubeta termostatizada a 37 ºC com 10 mm de espessura da solução, banda de passagem de 8 nm ou menos e luz espúria menor que 0,1%.

Pipetar 1,0 mL do Reagente de Trabalho em um tubo 12x75 e adicionar 0,02 mL de amostra. Homogeneizar. Transferir imediatamente para a cubeta termostatizada a 37°C. Esperar 30 segundos. Fazer a leitura da absorbância inicial (A1), disparando simultaneamente o cronômetro. Repetir a leitura após 2 minutos (A2).

**Cálculos**

$\Delta A$ Teste = $\frac{A_2 - A_1}{2}$

Atividade da Fosfatase Alcalina (U/L) = $\Delta A$ Teste x 2764

Conversão de U/L para Unidades SI: µkat = U/L x 0,0167

***Glicose***

**Princípio**

A glicose oxidase catalisa a oxidação da Glicose a Ácido Glucônico e Peróxido de Hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento, formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.

**Amostra**

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar plasma ou soro. Realizar a colheita do sangue utilizando um anticoagulante contendo um inibidor da glicólise. O uso do anticoagulante Glistab (Labtest cat. 29) permite a colheita de uma só amostra para as dosagens de creatinina, glicose e uréia. As amostras de sangue não contendo antiglicolítico devem ser centrifugadas imediatamente após a colheita e o plasma ou soro separados das células ou coágulo.

O analito é estável por 8 horas em amostras colhidas com antiglicolítico. No plasma, soro e outros líquidos separados das células, a glicose permanece estável por 3 dias entre 2 – 8°C, quando não ocorre contaminação bacteriana.

**Produto Utilizado**

Glicose PAP Liquiform, Catálogo 84-2/250, 84-2/500 -ANVISA - 10009010003

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C. Contém tampão 50 mmol/L; pH 7,5; glicose oxidase ≥11.000U/L; peroxidase ≥700 U/L; 4-aminoantipirina ≥290 µmol/L; fenol ≥1 mmol/L e azida sódica 7,5 mmol/L.

Padrão - 100 mg/dL: Armazenar entre 2 – 30°C. Após o manuseio, sugere-se armazenar bem vedado para evitar evaporação. Contém glicose 100 mg/dL e biocida não tóxico. O estabilizador do padrão pode precipitar-se em baixas temperaturas, fato que não interfere na sua qualidade.

**Equipamentos**

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 505 nm ou filtro verde (490 a 540 nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 ºC).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

**Procedimento**

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

| | Branco | Teste | Padrão |
|---|---|---|---|
| Amostra | ----- | 0,01 mL | ----- |
| Padrão (nº 2) | ----- | ----- | 0,01 mL |
| Reagente 1 | 1,0 mL | 1,0 mL | 1,0 mL |

Misturar vigorosamente e colocar em banho-maria a 37°C durante 15 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 505 nm ou filtro verde (490 a 540 nm), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

**Cálculos**

Glicose (mg/dL) = $\frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100$

Conversão de mg/dL para unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,0556

***Hemoglobina***

**Princípio**

O Ferro II do grupo heme da hemoglobina, oxihemoglobina e carboxihemoglobina é oxidado para o estado férrico pelo ferricianeto, formando hemiglobina (Hi), que se combina com o cianeto ionizado para produzir cianeto de hemiglobina (HiCN), que é medido em 540 nm.

**Amostra**

Não há preparo especial. Usar sangue total (citrato, oxalato ou EDTA). O material deve ser processado em 8 horas.

**Produto Utilizado**

Hemoglobina, Catálogo 43 - ANVISA - 10009010037
Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000
Reagente de Cor (Estoque): Armazenar entre 15 – 25°C. Não refrigerar.
Contém ferricianeto de potássio 60,7 mmol/L, cianeto de potássio 76,8 mmol/L e surfactante.
Reagente de Cor de Uso: Adicionar o conteúdo de um frasco de Reagente de Cor (10 mL) a 990 mL de água destilada ou deionizada e misturar. Estável 6 meses em frasco âmbar, entre 15 – 25°C. Não refrigerar. Não armazenar em frasco de plástico.

**Equipamentos**

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 540 nm ou filtro verde (520 a 550nm).
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

**Procedimento**

Tomar um tubo de ensaio e proceder como a seguir:

| | Teste |
|---|---|
| Reagente de Cor de Uso | 5,0 mL |
| Sangue total | 0,02 mL |

Homogeneizar e esperar 5 minutos. Determinar a absorbância do teste em 540 nm ou filtro verde (520 a 550 nm), acertando o zero com água destilada. A cor é estável por várias horas.

**Cálculos**

Obter o valor em g/dL utilizando o fator de calibração obtido com o Padrão de Hemoglobina-Labtest Catálogo 47.
Conversão de g/dL para Unidade SI:μ mol/L = g/dL x 1,61

***Proteínas Totais***

**Princípio**

Os íons cobre ($Cu^{+2}$) em meio alcalino (Reagente de Biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura, que tem absorbância máxima em 545 nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra.

**Amostra**

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro. O analito é estável por 3 dias entre 2 – 8°C e 7 dias a 10°C negativos.

**Produto Utilizado**

Proteínas Totais, Catálogo 99 - ANVISA - 10009010080
Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000
Reagente Biureto: Armazenar entre 15 – 30°C. Contém hidróxido de sódio 600 mmol/L, sulfato de cobre 12 mmol/L, estabilizador e antioxidante.
Padrão - 4,0 g/dL; Armazenar entre 15 – 30°C. Após o manuseio, sugere-se armazenar bem vedado para evitar evaporação. Contém albumina bovina 4 g/dL e azida sódica 15,4 mmol/L.

**Equipamentos**

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 545 nm (530 a 550 nm).
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

**Procedimento**

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

| | Branco | Teste | Padrão |
|---|---|---|---|
| Amostra | ----- | 0,02 mL | ----- |
| Padrão (nº 2) | ----- | ----- | 0,02 mL |
| Água destilada ou deionizada | 0,02 mL | ----- | ----- |
| Biureto de Uso | 1,0 mL | 1,0 mL | 1,0 mL |

Misturar e incubar a 37 °C durante 10 minutos. Determinar as absorbâncias do teste e do padrão em 545 nm (530 a 550 nm), acertando o zero com o branco. A cor é estável durante 1 hora.

**Cálculos**

Proteínas Toatais (g/dL) = $\frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 4$

***Tracilgliceróis***

**Princípio**

Os triacilglicerós são determinados de acordo com as seguintes reações:

Triglicérides $\xrightarrow{\text{Lipoproteína Lipase}}$ Glicerol + Ácidos Graxos

Glicerol + ATP $\xrightarrow{\text{Glicerolquinase}}$ Glicerol-3-Fosfato + ADP

Glicerol-3-Fosfato + $O_2$ $\xrightarrow{\text{Glicerol-3-Fosfato oxidase}}$ Dihidroxiacetona + $H_2O_2$

2 $H_2O_2$ + 4 Aminoantipirina + 4-Clorofenol  Quinoneimina + 4 $H_2O$

A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de triglicérides na amostra.

**Amostra**

Jejum de 12 a 14 horas. Usar soro ou plasma com EDTA. O analito é estável por dois dias entre 2 – 8°C. Armazenamento prolongado da amostra não é recomendado, porque várias substâncias podem ser hidrolizadas liberando glicerol, levando à obtenção de resultados falsamente elevados. A heparina promove a ativação in vivo ou in vitro da lipase da lipoproteína, fazendo com que a concentração dos triglicérides se reduza gradativamente em amostras contendo heparina.

**Produto Utilizado**

Triglicérides Liquiform, Catálogo 87 - ANVISA - 10009010070

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 ºC. Contem tampão 50 mmol/L, pH 6,9; acetato de magnésio 4 mmol/L; 4-clorofenol 5 mmol/L; 4-aminoantipirina 300 µmol/L ATP 1,0 mmol/L; lipase da lipoproteína ≥ 1400 U/L; glicerolquinase ≥ 1000 U/L e azida sódica 7 mmol/L.

Padrão - 200 mg/dL - Armazenar entre 2 - 30 ºC. Contém triglicérides 200 mg/dL e azida sódica 7 mmol/L.Após o manuseio sugere-se armazenar bem vedado, para evitar evaporação.

**Equipamentos**

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 505 nm ou filtro verde (490 a 520nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37°C).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

**Procedimento**

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

| | Branco | Teste | Padrão |
|---|---|---|---|
| Amostra | ----- | 0,01 mL | ----- |
| Padrão (nº 2) | ----- | ----- | 0,01 mL |
| Reagente 1 (nº 1) | 1,0 mL | 1,0 mL | 1,0 mL |

Misturar e colocar no banho-maria 37 ºC por 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 505 nm ou filtro verde (490 a 520 nm) acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

**Cálculos**

Triglicérides (mg/dL) = $\frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,0113

***Uréia***

**Princípio**

A uréia é hidrolisada pela urease a íons amônia e $CO_2$. Os íons amônia reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar azul de indofenol. A formação de cor é proporcional à quantidade de uréia na amostra.

**Amostra**

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (fluoreto, heparina, EDTA) e urina. Não usar anticoagulantes contendo amônia. A concentração de fluoreto na amostra não deve ser maior que 3 mg/mL, pois o fluoreto em altas doses é inibidor da urease. O uso do anticoagulante Glistab (Labtest Cat. 29) permite a colheita de uma só amostra para as dosagens de uréia, glicose e creatinina. O analito é estável no soro ou plasma por 12 horas entre 15 – 25°C, por 3 dias entre 2 – 8°C e 3 meses a 20°C negativos.

**Produto Utilizado**

Uréia CE, Catálogo 27 - ANVISA - 10009010011
Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000
Urease: Armazenar entre 2- 8°C. Contém tampão fosfato 10 mmol/L, EDTA 6 mmol/L e urease 268 KU/L.
Tampão (Estoque): Armazenar entre 2- 8°C. Contém tampão fosfato 100 mmol/L pH 6,9, salicilato de sódio 312 mmol/L, nitroprussiato de sódio 16,8 mmol/L.
Oxidante (Estoque): Armazenar entre 2- 8°C. Contém hidróxido de sódio 2,8 mol/L e hipoclorito de sódio 121 mmol/L.
Padrão - 70 mg/dl: Armazenar entre 2- 8°C bem vedado para evitar evaporação. Contém azida sódica 7,7 mmol/L.
Preparo do Tampão de Uso: Adicionar o conteúdo do frasco de tampão (100 mL) a 400 mL de água destilada ou deionizada e misturar. Estável 12 meses em frasco âmbar, entre 2 – 8°C.
Preparo do Oxidante de Uso: Adicionar o conteúdo do frasco de oxidante (25 mL) a 475 mL de água destilada ou deionizada e misturar. Estável 12 meses em frasco plástico, entre 2 e 8°C.
Preparo da Urease Tamponada: Adicionar 1,0 mL de urease a 20 mL do Tampão de Uso. Estável 21 dias em frasco de vidro âmbar, entre 2 – 8°C.

**Equipamentos**

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 600 nm (580 a 610 nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 ºC).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro

**Procedimento**

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

| | Branco | Teste | Padrão |
|---|---|---|---|
| Amostra | ----- | 0,01 mL | ----- |
| Padrão (nº 2) | ----- | ----- | 0,01 mL |
| Urease tamponada | 1,0 mL | 1,0 mL | 1,0 mL |

Misturar e incubar a 37 ºC durante 5 minutos e adicionar 1,0mL de oxidante de uso em todos os tubos. Misturar e incubar a 37 ºC durante 5 minutos. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 600 nm (580 a 610 nm), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 2 horas.

**Cálculos**

Uréia (mg/dL) = $\frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/ dL x 0,166

**Anexo III – Resumo tabelado dos resultados dos experimentos 1, 2 e 3.**

**EXPERIMENTO 1 (MACHOS-AOAC) X EXPERIMENTO 2 (FÊMEAS-AOAC)**

| | | | MACHOS DIETA AOAC | FÊMEAS DIETA AOAC |
|---|---|---|---|---|
| Perfil Lipídico | Colesterol total | Dieta | H↑ | H↑ |
| | | Bixina | E.O.B↓ | E.O.B↓ |
| | | Interação | p <0,05 | p <0,05 |
| | Colesterol HDL | Dieta | H↓ | H↓ |
| | | Bixina | E.O.B↑ | E.O.B↑ |
| | | Interação | p <0,05 | p <0,05 |
| | Colesterol não-HDL | Dieta | H↑ | H↑ |
| | | Bixina | E.O.B↓ | E.O.B↓ |
| | | Interação | p <0,05 | p <0,05 |
| | Índice aterogênico | Dieta | H↑ | H↑ |
| | | Bixina | E.O.B↓ | E.O.B↓ |
| | | Interação | p <0,05 | p <0,05 |
| | Triacilgliceróis | Dieta | NS | NS |
| | | Bixina | E.O.B↓ | E.O.B↑ |
| | | Interação | NS | NS |
| | % de gordura hepática | Dieta | H↑ | H↑ |
| | | Bixina | E.O.B↓ | E.O.B↓ |
| | | Interação | p <0,05 | p <0,05 |
| | % de gordura fecal | Dieta | H↑ | H↑ |
| | | Bixina | E.O.B↓ | E.O.B↑ |
| | | Interação | p <0,05 | p <0,05 |
| Perfil Hepático | Peso relativo do fígado | Dieta | H↑ | H↑ |
| | | Bixina | NS | NS |
| | | Interação | NS | NS |
| | ALT | Dieta | H↓ | NS |
| | | Bixina | E.O.B↓ | NS |
| | | Interação | p <0,05 | p <0,05 |
| | AST | Dieta | H↑ | NS |
| | | Bixina | E.O.B↓ | NS |
| | | Interação | p <0,05 | NS |
| | ALP | Dieta | H↑ | H↑ |
| | | Bixina | E.O.B↑ | NS |
| | | Interação | NS | p <0,05 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Perfil Renal** | **Peso relativo dos rins** | **Dieta** | NS | NS |
| | | **Bixina** | NS | E.O.B↑ |
| | | **Interação** | NS | p <0,05 |
| | **Uréia** | **Dieta** | NS | H↓ |
| | | **Bixina** | E.O.B↓ | E.O.B↑ |
| | | **Interação** | NS | p <0,05 |
| | **Creatinina** | **Dieta** | * | H↑ |
| | | **Bixina** | * | E.O.B↓ |
| | | **Interação** | * | p <0,05 |
| **Status antioxidante** | **Sulfidrilas totais** | **Dieta** | H↓ | H↓ |
| | | **Bixina** | E.O.B↑ | NS |
| | | **Interação** | NS | NS |
| | **Sulfidrilas livres** | **Dieta** | NS | NS |
| | | **Bixina** | E.O.B↑ | E.O.B↑ |
| | | **Interação** | NS | p <0,05 |
| | **Sulfidrilas ligadas à proteínas** | **Dieta** | H↓ | NS |
| | | **Bixina** | NS | E.O.B↑ |
| | | **Interação** | NS | NS |
| **Demais parâmetros bioquímicos** | **Glicose** | **Dieta** | H↓ | NS |
| | | **Bixina** | E.O.B↓ | NS |
| | | **Interação** | p <0,05 | NS |
| | **Proteínas totais** | **Dieta** | NS | H↑ |
| | | **Bixina** | E.O.B↓ | NS |
| | | **Interação** | p <0,05 | NS |
| | **Albumina** | **Dieta** | H↓ | H↑ |
| | | **Bixina** | E.O.B↓ | E.O.B↓ |
| | | **Interação** | p <0,05 | NS |

*H: Dietas hipercolesterolemiantes*
*E.O.B: Extrato oleoso de bixina P.A.Lipo 8%*
*NS: estatisticamente não significativo; p> 0,05: estatisticamente significativo*
*Setas para cima (↑) indicando elevação e setas para baixo (↓) indicando redução*
* Dosagem não realizada

**EXPERIMENTO 2 (FÊMEAS - AOAC) X EXPERIMENTO 3 (FÊMEAS – AIN-93)**

| | | | FÊMEAS AOAC | FÊMEAS AIN-93 |
|---|---|---|---|---|
| Perfil Lipídico | Colesterol total | Dieta | H↑ | H↑ |
| | | Bixina | E.O.B↓ | E.O.B↑ |
| | | Interação | p <0,05 | p <0,05 |
| | Colesterol HDL | Dieta | H↓ | H↓ |
| | | Bixina | E.O.B↑ | E.O.B↑ |
| | | Interação | p <0,05 | p <0,05 |
| | Colesterol não-HDL | Dieta | H↑ | H↑ |
| | | Bixina | E.O.B↓ | E.O.B↑ |
| | | Interação | p <0,05 | p <0,05 |
| | Índice aterogênico | Dieta | H↑ | H↑ |
| | | Bixina | E.O.B↓ | E.O.B↑ |
| | | Interação | p <0,05 | p <0,05 |
| | Triacilgliceróis | Dieta | NS | H↓ |
| | | Bixina | E.O.B↑ | E.O.B↓ |
| | | Interação | NS | NS |
| | % de gordura hepática | Dieta | H↑ | H↑ |
| | | Bixina | E.O.B↓ | NS |
| | | Interação | p <0,05 | NS |
| | Colesterol hepático | Dieta | H↑ | H↑ |
| | | Bixina | E.O.B↓ | NS |
| | | Interação | p <0,05 | NS |
| | Triacilgliceróis hepáticos | Dieta | H↑ | H↑ |
| | | Bixina | E.O.B↓ | E.O.B↑ |
| | | Interação | p <0,05 | p <0,05 |
| | % de gordura fecal | Dieta | H↑ | H↑ |
| | | Bixina | E.O.B↑ | E.O.B↑ |
| | | Interação | p <0,05 | p <0,05 |
| | Colesterol fecal | Dieta | H↑ | H↑ |
| | | Bixina | E.O.B↓ | E.O.B↑ |
| | | Interação | p <0,05 | NS |
| | Triacilgliceróis fecal | Dieta | H↑ | H↑ |
| | | Bixina | E.O.B↓ | E.O.B↑ |
| | | Interação | p <0,05 | p <0,05 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Perfil Hepático** | **Peso relativo do fígado** | **Dieta** | H↑ | NS |
| | | **Bixina** | NS | NS |
| | | **Interação** | NS | NS |
| | **ALT** | **Dieta** | NS | H↑ |
| | | **Bixina** | NS | NS |
| | | **Interação** | p <0,05 | NS |
| | **AST** | **Dieta** | NS | H↑ |
| | | **Bixina** | NS | NS |
| | | **Interação** | NS | NS |
| | **ALP** | **Dieta** | H↑ | H↑ |
| | | **Bixina** | NS | E.O.B↑ |
| | | **Interação** | p <0,05 | p <0,05 |
| **Perfil Renal** | **Peso relativo dos rins** | **Dieta** | NS | NS |
| | | **Bixina** | E.O.B↑ | NS |
| | | **Interação** | p <0,05 | NS |
| | **Uréia** | **Dieta** | H↓ | NS |
| | | **Bixina** | E.O.B↑ | NS |
| | | **Interação** | p <0,05 | NS |
| | **Creatinina** | **Dieta** | H↑ | H↑ |
| | | **Bixina** | E.O.B↓ | E.O.B↓ |
| | | **Interação** | p <0,05 | p <0,05 |
| **Status antioxidante** | **Sulfidrilas totais** | **Dieta** | H↓ | NS |
| | | **Bixina** | NS | E.O.B↑ |
| | | **Interação** | NS | NS |
| | **Sulfidrilas livres** | **Dieta** | NS | NS |
| | | **Bixina** | E.O.B↑ | E.O.B↑ |
| | | **Interação** | p <0,05 | p <0,05 |
| | **Sulfidrilas ligadas à proteínas** | **Dieta** | NS | NS |
| | | **Bixina** | E.O.B↑ | E.O.B↑ |
| | | **Interação** | NS | NS |
| | **Atividade arielesterase da PON** | **Dieta** | H↓ | H↓ |
| | | **Bixina** | NS | E.O.B↑ |
| | | **Interação** | p <0,05 | p <0,05 |
| | **Atividade paraoxonase da PON** | **Dieta** | NS | H↓ |
| | | **Bixina** | NS | E.O.B↓ |
| | | **Interação** | p <0,05 | p <0,05 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Demais parâmetros bioquímicos** | **Glicose** | **Dieta** | NS | H↑ |
| | | **Bixina** | NS | NS |
| | | **Interação** | NS | NS |
| | **Proteínas totais** | **Dieta** | H↑ | H↑ |
| | | **Bixina** | NS | E.O.B↓ |
| | | **Interação** | NS | NS |
| | **Albumina** | **Dieta** | H↑ | NS |
| | | **Bixina** | E.O.B↓ | E.O.B↑ |
| | | **Interação** | NS | NS |

*H: Dietas hipercolesterolemiantes*
*E.O.B: Extrato oleoso de bixina P.A.Lipo 8%*
*NS: estatisticamente não significativo; p> 0,05: estatisticamente significativo*
*Setas para cima (↑) indicando elevação e setas para baixo (↓) indicando redução.*