

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**ATIVIDADE HIPOLIPIDÊMICA E PROTETORA DA BIXINA NO
FÍGADO DE RATOS TRATADOS COM DIETA HIPERCALÓRICA**

Raquel de Cássia Pereira
Engenheira de Alimentos

ARAÇATUBA - SP
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

**ATIVIDADE HIPOLIPIDÊMICA E PROTETORA DA BIXINA NO
FIGADO DE RATOS TRATADOS COM DIETA HIPERCALÓRICA**

Raquel de Cássia Pereira
Orientador: Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP - Campus de Araçatuba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA - SP
2013

Pereira, Raquel de Cássia

P436a

Atividade hipolipidêmica e protetora da bixina no fígado de ratos tratados com dieta hipercalórica/ Raquel de Cássia Pereira. -- Araçatuba: [s.n], 2013.
00 f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto

1. Bixaceae. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Estresse oxidativo. 4. Antioxidante. 5. Carotenoides. 6. Fígado I. T.

CDD 586.625

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Atividade hipolipidêmica e protetora da bixina no fígado de ratos tratados com dieta hipercalórica.


AUTORA: RAQUEL DE CÁSSIA PEREIRA

ORIENTADOR: Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dra. ELISA MARIA DE SOUSA RUSSO


Dra. ELISA HELENA GIGLIO PONSANO


Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

DATA DA REALIZAÇÃO: 6 de dezembro de 2013.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Raquel de Cássia Pereira- nascida em Adamantina (SP) no dia 19 de novembro de 1989, ingressou no curso de bacharelado em Engenharia de Alimentos pela FAI - Faculdades Adamantineses Integradas - Campus de Adamantina (SP) em fevereiro de 2007, obtendo o título de Engenheira de Alimentos em dezembro de 2010. Em fevereiro de 2012, ingressou no curso de Mestrado em Ciência Animal pela UNESP, Campus de Araçatuba (SP), na área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica sob orientação do Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto, responsável pelas disciplinas de Bioquímica Animal e Química Geral do curso de graduação em Zootecnia da UNESP, Campus de Dracena. Ao longo do mestrado foi bolsista CAPES, concluindo o mestrado em dezembro de 2013.

*“Esquece a esperança e entra na dança
Que as coisas não caem do céu...”*

Leoni

DEDICO:

Aos meus amados pais e irmão.

Agradecimentos

Tantas são as pessoas qualificadas para aparecer neste espaço, que sinto não conseguir escrever a todas.

Meu querido Orientador Prof. Fábio Mingatto, minha eterna gratidão por dividir toda sua experiência e sabedoria comigo.

Meus amados pais e Nando, sem vocês eu realmente nada seria (literalmente), agradeço sempre pelo apoio e pela paciência com essa filha tão cheia de defeitos. Amo vocês!

Ao, meu companheiro, amigo, namorado, muito obrigada pelo apoio!

Querida Tia Adriana e Tio Carlos, como não agradecê-los por me apoiarem sempre que grito. Vocês fazem, sem dúvidas, parte da minha vida nos melhores (e piores) momentos.

Muito obrigada a equipe LaBMetiana e aos técnicos Edison e Marcelo.

*E por último, mas não menos importante, minha chefe Hyllana Medeiros. O que seria dessa dissertação sem você? Obrigada minha **AMIGA!***

Acredito que este ano foi o melhor que já vivi, aqui, muita coisa aconteceu, ótimas pessoas conhecidas, enfim, que ano!

Muito obrigada a todos que contribuíram de alguma forma!

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Objetivo.....	19
1.1.1 Objetivo geral.....	19
1.1.2 Objetivo específico.....	19
1.2 Hipótese.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Fígado.....	20
2.1.1 Funções hepáticas.....	20
2.1.2 Lesões hepáticas.....	21
2.2 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e estresse oxidativo.....	21
2.2.1 Sistema de defesa antioxidante.....	23
2.2.1.1 Prevenção de formação de ERO.....	24
2.2.1.2 Eliminação de ERO.....	24
2.2.1.2.1 Sistema antioxidante enzimático.....	24
2.2.1.2.2 Sistema antioxidante não enzimático.....	24
2.2.2 Danos oxidativo causados pelas ERO.....	26
2.2.2.1 Peroxidação lipídica.....	26
2.3 Dieta hipercalórica e estresse oxidativo.....	27
2.4 Aditivos na indústria de alimentos.....	28
2.5 Urucum.....	29
2.6 Bixina.....	20
3 MATERIAL E MÉTODO.....	31
3.1 Avaliação ética.....	31
3.2 Animais.....	32
3.3 Dieta hipercalórica.....	32
3.4 Obtenção da bixina.....	33
3.5 Eutanásia.....	33
3.6 Análises Bioquímicas.....	33
3.6.1 Análise de colesterol total e triglicérides.....	34
3.6.2 Análise das enzimas indicadoras de função hepática.....	34

3.6.3	Preparação do homogenato de fígado de rato.....	34
3.6.3.1	Determinação da concentração de GSH.....	34
3.6.3.2	Determinação do estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)	35
3.6.3.3	Atividade da enzima glutathion redutase (GR).....	35
3.6.3.4	Atividade da enzima glutathion peroxidase (GPx).....	35
3.6.3.5	Avaliação da peroxidação de lipídios.....	36
3.7	Análise estatística.....	36
4	RESULTADOS.....	37
4.1	Análise da avaliação de peso dos ratos.....	37
4.2	Análise da concentração de colesterol de triglicérides.....	37
4.3	Análise da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).....	38
4.4	Determinação da concentração de GSH no homogenato.....	39
4.5	Determinação do estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H).....	40
4.6	Análise da atividade da glutathion redutase (GR) e glutathion peroxidase (GPx).....	41
4.7	Peroxidação de lipídios de membrana.....	42
5	DISCUSSÃO.....	42
6	CONCLUSÃO.....	45
7	REFERÊNCIAS.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
ALT	Alanina transaminase e/ou alanina aminotransferase
AST	Aspartato transaminase e/ou aspartato aminotransferase
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Catalase
C₂₅H₃₀O₄	Fórmula estrutural da bixina
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
e⁻	Elétron
EGTA	Acido etilenoglicol bis-(β-aminoetil éter) N,N,N',N' tetracético
EPM	Erro padrão da média
ERRO	Espécie reativa de oxigênio
FADH₂	Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
GLUT-2	Transportador de glicose tipo 2
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
H⁺	Íon hidrogênio
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	Ácido 2 [4(2 hidroxietil) piperazinil(1)] etanossulfônico
Kg	Quilograma
KOH	Hidróxido de potássio
LOO[•]	Radical peroxila
L[•]	Radical lipídico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Radical alcoxila
LOOH	Peroxila
LO[•]	Radical hidroxila
nM	Nanomolar

LOOL	Lipídio oxidado
mM	Milimolar
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
O	Oxigênio
OPT	o-ftalaldeído
O₂	Oxigênio molecular
S	Segundos
O₂⁻	Radical superóxido
OH[•]	Radical hidroxila
pH	Potencial hidrogeniônico
SOD	Superóxido dismutase

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1.	Comparação da dieta padrão e hipercalórica (H) em 100 gramas.....	33
Figura 1.	Classificação e nomenclatura as espécies reativas de oxigênio.....	22
Figura 2.	Reação de Fenton.....	22
Figura 3.	Ação da enzima catalase.....	25
Figura 4.	Sistema antioxidante enzimático.....	25
Figura 5.	Etapas da peroxidação lipídica.....	27
Figura 6.	Fotos de urucum. A: Urucuzeiro e B: cachopa com frutos e sementes expostas.....	29
Figura 7.	Estrutura do carotenoide bixina, cis e trans.....	30
Figura 8.	Foto das rações. A: dieta padrão (C); B: dieta controle + bixina (CB); C: dieta hipercalórica (H) e D: dieta hipercalórica + bixina (HB).....	33
Figura 9.	Análise da variação do peso dos ratos.....	37
Figura 10.	Concentração de colesterol e triglicérides no soro sanguíneo dos ratos.....	38
Figura 11.	Atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) (A) e aspartato aminotransferase (AST) no soro sanguíneo dos ratos.....	39
Figura 12.	Concentração de glutathiona reduzida (GSH) (A) no homogenato do fígado dos ratos.....	40
Figura 13.	Determinação do estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H) no homogenato do fígado dos ratos..	40
Figura 14.	Atividade das enzimas glutathiona redutase (GR) (A) e glutathiona peroxidase (GPx) (B) no homogenato do fígado dos ratos.....	41
Figura 15.	Concentração de malondialdeído (MDA) no homogenato do fígado dos ratos.....	42

RESUMO

A evolução industrial, o declínio do nível de atividade física aliados à adoção de modos alimentares pouco saudáveis, com a adesão a um padrão de dieta rica em alimentos com alta densidade energética e baixa concentração de nutrientes, assim como o aumento do consumo de alimentos ultra processados e o consumo excessivo de nutrientes como sódio, gorduras e açúcar tem relação direta com o aumento da obesidade e demais doenças crônicas, como o diabetes e a hipertensão. A bixina, proveniente das sementes de urucum, tem sido muito utilizada pela indústria de alimentos como corante, e é um dos mais eficazes supressores biológicos de oxigênio molecular podendo contribuir para a proteção das células e tecidos contra os efeitos deletérios dos radicais livres. No presente trabalho foi avaliado o efeito hipolipidêmico e hepatoprotetor da bixina em ratos tratados com uma dieta hipercalórica. Os ratos foram divididos em 4 grupos de seis animais cada: Grupo controle (C), com dieta padrão, Grupo CB, que recebeu dieta padrão adicionada de bixina, Grupo H que recebeu a dieta hipercalórica e Grupo HB que recebeu dieta hipercalórica adicionada de bixina. Após o período experimental (oito semanas), amostras de sangue e tecido hepático foram colhidos para a realização das dosagens bioquímicas. A bixina inibiu a liberação da enzima ALT no soro e favoreceu a manutenção da atividade das enzimas Glutathione redutase e peroxidase e evitou a lipoperoxidação no fígado, porém não apresentou efeito hipolipidemiante. Os resultados indicaram que a bixina protege o fígado dos ratos dos danos provocados pela ingestão de dieta hipercalórica, e esta proteção pode estar principalmente relacionada com a atividade antioxidante da substância.

Palavras-chave: Bixacea, dieta hiperlipídica, estresse oxidativo, antioxidante, carotenoides, fígado.

ABSTRACT

The industrial developments, the decline of physical activity coupled with the adoption of modes of eating unhealthy with adherence to a dietary pattern rich in foods with high energy density and low nutrient concentrations, increased consumption of ultra-processed foods and excessive consumption of nutrients such as sodium, fats and sugar is directly related to the increase in obesity and other chronic diseases such as diabetes and hypertension. Thus the intake of high caloric diet is greater than recommended, and has long-term negative consequences. Bixin from annatto seeds has been widely used by the food industry, as a dye, and is one of the most effective suppressors of biological molecular oxygen and can contribute to protecting cells and tissues against to the deleterious effects of free radicals. In the present work we evaluated the hypolipidemic and hepatoprotective effect of bixin in rats treated with a high calorie diet. The rats were divided into four groups of six animals each: Control group (C), which received a standard diet, BC Group, which received standard diet plus bixin, Group H which received a high calorie diet and HB Group which received a high calorie diet plus bixin. After the trial period (8 weeks) blood samples and liver tissue were collected for biochemical tests. The bixin favored the maintenance of the enzymes glutathione reductase and peroxidase and prevented lipid peroxidation. The bixin showed no lipid-lowering effect. Our results indicate that bixin protects the liver from damage caused by high calorie diet, and this protection may be primarily related to the antioxidant activity of the substance.

Keywords: Bixacea, high fat diet, oxidative stress, antioxidant, carotenoids, liver.

1. INTRODUÇÃO

Nas sociedades modernas, o consumo regular de dietas hipercalóricas tem sido uma característica associada à obesidade tanto em humanos como em animais. Uma característica especial dos mamíferos é sua capacidade de armazenar energia a fim de garantir sua sobrevivência em momentos de escassez alimentar. Este estoque pode ser constituído por proteínas, carboidratos (sob a forma de glicogênio) ou lipídios (sob a forma de triglicérides), mas são estes últimos que fornecem a maior quantidade de calorías por unidade de massa quando são oxidados. Portanto, é o tecido adiposo o principal estoque de energia do organismo (SILVA, 2009). Neste contexto, o aumento de peso vem crescendo em sua magnitude epidemiológica no mundo todo, ocupando importante espaço no perfil de morbimortalidade, sendo apresentado como um grave problema populacional nos últimos anos, atingindo níveis consideráveis na saúde pública (CARRARA et al., 2008) com o risco de desenvolver doença aterosclerótica com o surgimento de eventos cardiovasculares (PARENTE et al., 2006), além de doenças metabólicas, tais como resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, etc. (SILVA, 2009).

O fígado desempenha um papel fundamental no organismo, pois está estrategicamente situado no sistema circulatório, recebendo um suprimento sanguíneo duplo: cerca de 20% do seu fluxo é rico em O_2 e provém da artéria hepática, enquanto os restantes (80%) são ricos em nutrientes e provém da veia porta. Esta particularidade permite ao fígado controlar as substâncias que são absorvidas em todo o intestino e determinar quais delas vão entrar, e como vão entrar na circulação sistêmica, além de ser o responsável pela biotransformação dos xenobióticos tornando-os mais hidrossolúveis para serem eliminados (GUILLOUZO, 1998).

As mitocôndrias são responsáveis pela síntese da quase totalidade do trifosfato de adenosina (ATP) necessário à manutenção da estrutura e função celular, porém, são também importantes fontes intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO). Uma fração (3-5%) do O_2 disponível para a cadeia respiratória mitocondrial sofre redução incompleta gerando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o qual é dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BOVERIS; CHANCE, 1973). As defesas antioxidantes mitocondriais incluem as enzimas glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), NAD(P) transidrogenase, glutathione reduzida (GSH) e os

nucleotídeos de piridina (NAD(P)H). O aumento na geração de O_2^{\cdot} ou a diminuição nas defesas antioxidantes, em presença de Fe^{2+} , resulta na produção do radical hidroxila (OH^{\cdot}) que por ser altamente reativo causa danos oxidativos a moléculas biológicas, como por exemplo, peroxidação dos lipídios de membrana (HALLIWELL; CHIRICO, 1993; GUTTERIDGE, 1995).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar na morte celular (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 1994). Este tipo de lesão oxidativa é definido como estresse oxidativo, que segundo Sies (1993), designa uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes.

O estresse oxidativo é atualmente associado com inúmeras doenças crônicas, tais como câncer, diabetes mellitus, dieta hipercalórica, doenças cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos e também com o processo de envelhecimento (SILVA, 2009). Desta forma, o reconhecimento da hipercolesterolemia e estresse oxidativo como fatores de risco para as doenças cardiovasculares levaram a uma busca por alimentos que fossem eficazes na redução dos níveis de colesterol e radicais livres, além de um crescente entusiasmo sobre o uso de antioxidantes como agentes antiaterogênicos (GONÇALVES et al., 2006).

Bixa orellana L., é uma árvore nativa das florestas tropicais da América do Sul, América Central e Ásia. É conhecida por diversos nomes como urucum, açafoa, açafoeira-da-terra, achiote, annatto, conforme a região (COELHO et al., 2003). É a mais importante fonte de corante natural empregada na indústria de alimentos, correspondendo em torno de 90% do total de consumo de corantes naturais no Brasil e em torno de 70% de corantes naturais mundialmente empregados em alimentos (PEDROSA et al., 1999).

Trata-se de uma cultura que vem conquistando cada vez mais importância econômica, uma vez que do pericarpo da semente se extrai um corante natural, cujo pigmento é constituído por vários carotenoides, predominando a bixina, a qual representa mais de 80% dos carotenoides totais presentes (PEDROSA et al., 1999). A bixina mostrou-se um dos mais efetivos agentes sequestrantes do oxigênio singlete (LIMA et al., 2001).

Segundo Silva et al., (2010) os carotenoides, que possuem mais de 600 variantes estruturais, são encontrados em bactérias, algas, fungos e plantas superiores, em alguns crustáceos e em plumagem de aves, e possuem, ainda, ligações duplas conjugadas em suas estruturas, atuam como antioxidantes, sendo de grande importância na prevenção da aterosclerose, doença esta, relacionada com uma dieta hipercalórica.

Há trabalho indicando, que a bixina não apresenta toxicidade (BAUTISTA et al., 2004) e que inibe a peroxidação lipídica em modelos de nefrotoxicidade (SILVA et al., 2001) e hepatotoxicidade (MOREIRA, 2012). As propriedades e peculiaridades aliadas ao seu potencial antioxidante, tornam o carotenoide bixina um bom alvo de pesquisa para os eventos associados à hiperlipidemia (LIMA, 2013) e podendo, num futuro próximo, ser viabilizado como medicamento no controle do metabolismo lipídico (HUBER, 2008).

O colesterol é essencial no organismo humano para a síntese de membranas celulares e de hormônios entre outras funções e pode ser obtida através de síntese endógena ou por dieta. Por ser uma substância insolúvel no sangue, o colesterol é transportado por dois tipos de proteínas transportadoras: as lipoproteínas de alta densidade (HDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), (SILVA, et al. 2006).

As HDL são as principais transportadoras de fosfolípidios. Quando estão circulando na corrente sanguínea, elas captam parte do colesterol que está em excesso no sangue e o transporta até o fígado, onde ele é convertido em bile (LUDUVING, 1997).

Após ser absorvido pelo intestino, o colesterol é transportado até os tecidos sob a forma de LDL. O excesso de colesterol no sangue prejudica a captação desse complexo pela célula: ele se oxida e começa a depositar-se na parede das artérias, causando aterosclerose. Os carotenoides são captados neste processo e impedem esta oxidação. A lipoproteína LDL, quando oxidada, danifica o endotélio e, por conseguinte, a ação antioxidante dos carotenoides, entre os quais se incluem a bixina e a norbixina, pode proteger o endotélio dos danos desta lipoproteína (LUDUVING, 1997).

Toda vez que o consumo de alimentos excede a demanda energética, ocorre o acúmulo de reservas (glicogênio e triglicérides) (MALHEIROS, 2006). Dessa forma, a ingestão de uma dieta altamente calórica resulta num estado pós-prandial de hipertrigliceridemia, hiperglicemia e níveis elevados de ácidos graxos livres na

circulação, gerando um estado de estresse oxidativo (ESPOSITO; GIUGLIANO, 2006; MARZZOCO; TORRES, 2007).

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito protetor da bixina sobre a hiperlipidemia e os danos hepáticos provocados por uma dieta hipercalórica e os mecanismos envolvidos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Induzir hiperlipidemia por dieta hipercalórica;
- Induzir danos hepáticos pela dieta hipercalórica;
- Induzir o estresse oxidativo pela dieta hipercalórica;
- Avaliar o efeito hipolipidêmico e hepatoprotetor da bixina;
- Avaliar o efeito antioxidante da bixina.

Para tanto, foram avaliados os seguintes parâmetros bioquímicos: concentração de colesterol e triglicérides e atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no soro; atividade das enzimas glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx), concentração de glutathione reduzida (GSH), estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H) e lipoperoxidação no homogenato de fígado de rato.

1.2 Hipótese

A hiperlipidemia e o dano hepático provenientes de uma dieta hipercalórica podem ser reduzidos com a ingestão de bixina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fígado

2.1.1 Funções hepáticas

O fígado recebe aproximadamente 25% do débito cardíaco total, o que lhe permite realizar numerosas funções vitais, essenciais à manutenção da homeostasia corporal. Destaca-se a regulação do metabolismo de diversos nutrientes, síntese proteica e de outras moléculas, armazenamento de vitaminas e ferro, degradação hormonal e a inativação e excreção de drogas e toxinas (SCHINONI, 2006).

Devido à sua interposição entre o trato digestivo e a circulação geral do organismo, o fígado desempenha uma função central no metabolismo. Entre as principais funções hepáticas estão a captação de aminoácidos, lipídios, carboidratos e vitaminas, com subsequente armazenamento, conversão metabólica e liberação no sangue e bile. O fígado é também o principal órgão envolvido na biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos), com capacidade de converter compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, mais facilmente eliminados pelo organismo (GUILLOUZO, 1998).

O hepatócito lida com todas as moléculas seguindo 3 passos fundamentais:

- Captação de substâncias plasmáticas através de vários transportadores e canais existentes na sua membrana basolateral;
- Processamento dessas substâncias o que inclui o transporte e modificação química intracelular através de numerosas enzimas e cofatores – este passo é essencial já que muitas das substâncias captadas pelos hepatócitos são lipofílicas e estas modificações tornam as substâncias mais hidrossolúveis permitindo a sua posterior excreção em nível renal ou pela bile;
- Secreção de substâncias. Esta secreção pode ser uma forma de excreção, isto é, secreção através da membrana apical para a bile, mas também pode ser uma secreção para o plasma sendo a substância reutilizada (SCHINONI, 2006).

2.1.2 Lesões hepáticas

Os danos hepáticos podem ter várias formas. Alguns agentes levam à necrose, esteatose, cirrose ou carcinoma (TOLMAN; SIRRINE, 1998; ZIMMERMAN, 1998). Outros levam apenas a interferências na secreção biliar e icterícia, com pequena ou nenhuma lesão evidente ao parênquima hepático (ROUILLER, 1964; ZIMMERMAN, 1998). Alguns produzem lesões degenerativas ou vasculares.

As transaminases são indicadores sensíveis de dano hepático, particularmente quando é uma lesão aguda. A AST existe também em outros tecidos como o coração, músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas e, portanto, é muito menos específica de lesão hepática do que a ALT que existe primariamente no fígado (SCHINONI, 2006). Portanto quando ocorre uma lesão hepática há refluxo de ambas as enzimas para o plasma com elevação dos níveis de ambas as enzimas, sendo que a ALT sobe ligeiramente mais do que a AST se a lesão for puramente hepática (SCHINONI, 2006).

Assim segundo Chaves et al. 2012, uma dieta hipercalórica pode levar a alterações histopatológicas importantes, causando uma elevação de enzimas hepáticas e alteração na função hepática, podendo variar de esteatose a esteato-hepatite, fibrose e cirrose.

2.2 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e estresse oxidativo

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo animal e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Radical livre refere-se, portanto, a um átomo ou molécula altamente reativa que tenha um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica. As espécies não radicais são agentes oxidantes e podem se converter em radicais livres. Todo radical livre é uma espécie reativa, mas nem toda espécie reativa é um radical livre (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Os radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) (Figura 1). No organismo, as ERO encontram-se envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de

membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS, 2006).

Espécies Reativas
Radicais Livres
Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's)
Superóxido (O_2^{\cdot})
Hidroxila (OH^{\cdot})
Hidroperoxila (HO_2^{\cdot})
Peroxila (RO_2^{\cdot})
Alcoxila (RO^{\cdot})
Carbonato (CO_3^{\cdot})
Dióxido de Carbono (CO_2^{\cdot})

Figura 1. Classificação e nomenclatura das espécies reativas de oxigênio (BARREIROS, 2006)

As ERO podem ser derivadas de fontes exógenas ou produzidas endogenamente como consequência normal das funções celulares, por diversas enzimas que utilizam o oxigênio (O_2) como substrato (FINKEL; HOLBROOK, 2000; FINKEL, 2003). Resulta da excitação do O_2 para formar oxigênio singleto (1O_2) ou da redução do O_2 , nas mitocôndrias, pela citocromo oxidase (caa3) – que catalisa a transferência de um, dois e três elétrons – originando, respectivamente, radical superóxido (O_2^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) (ANTUNES NETO; PAULA, 2011).

As mitocôndrias são importantes fontes de O_2^{\cdot} e, como a presença deste ânion-radical pode causar sérios danos, elas são ricas em superóxido dismutase (SOD) que o converte em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio isoladamente é praticamente inócuo, porém pode se difundir facilmente através das membranas celulares como, por exemplo, a membrana do núcleo. Devido ao fato da célula possuir metais de transição, ocorre geração do radical OH^{\cdot} em seu interior (reação de Fenton, Figura 2), (BARREIROS, 2006).

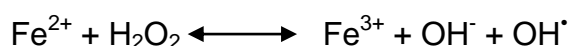


Figura 2. Reação de Fenton (Barreiros, 2006).

O radical OH^{\cdot} é formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação de H_2O_2 com metais de transição e radiólise da água por exposição à

radiação ionizante e é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Esse radical frequentemente ataca as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações (BARREIROS, 2006).

Por serem extremamente reativos, níveis elevados de ERO podem causar danos ao DNA (deleções, mutações e translocações; além de oxidação de filamentos), às proteínas (modificações locais específicas nos aminoácidos, fragmentação da corrente do peptídeo e aumento da susceptibilidade da proteólise) e aos lipídios (alterações em propriedades de membranas biológicas) (ANTUNES NETO; PAULA, 2011).

A fim de minimizar os efeitos das ERO, organismos aeróbios desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante (FINKEL, 2003; SCANDALIOS, 2005). Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em concentrações mais baixas que a do substrato oxidável, é capaz de atrasar ou inibir significativamente a oxidação do mesmo (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 1994). Para tanto, previnem a formação destas espécies; interceptam-nas assim que formadas; reparam o dano oxidativo ocasionado por elas; aumentam a eliminação das moléculas danificadas e aumentam a eliminação também das não excessivamente danificadas, para minimizar a formação de mutações (GUTTERIDGE, 1995).

O estresse oxidativo, portanto, resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, com dano consequente (RIBEIRO et al., 2005).

2.2.1 Sistema de defesa antioxidante

O surgimento do oxigênio na atmosfera, ao longo dos períodos evolucionários, trouxe como consequência a sua toxicidade, já que seus metabólitos são muito reativos. Em consequência disso, alguns organismos morreram, alguns escolheram processos de obtenção de energia diferentes (anaerobiose) e outros, considerados oportunistas, desenvolveram a habilidade de utilizar o oxigênio para extrair mais energia dos nutrientes, em decorrência de seu alto potencial eletroquímico e tiveram que se adaptar para se defenderem dos efeitos deletérios do oxigênio (RIBEIRO et al., 2005)

Assim, segundo Ribeiro et al. (2005), a formação endógena de ERO é uma consequência indiscutível do metabolismo aeróbio.

Para defender-se da toxicidade das ERO, o organismo apresenta mecanismo de defesa, em dois níveis distintos (RIBEIRO et al., 2005):

1. Prevenção da formação de ERO;
2. Eliminação de ERO formadas.

2.2.1.1 Prevenção da formação de ERO

Segundo Sies (1993), a prevenção da formação da espécie reativa de oxigênio inclui mecanismos antioxidantes. Citam-se exemplos: restrição de spin do oxigênio, o que diminui sua reatividade com biomoléculas, o transporte de oxigênio na forma ligada e não livre, a quelação de metais durante transporte e armazenamento, evitando a ocorrência da reação de Fenton, a eficiência da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria que mantém a formação de ERO em nível controlado.

2.2.1.2 Eliminação de ERO formadas

Como citado por Schneider (2004) as ERO são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo e todas as células possuem mecanismos para mitigar seus efeitos agressores. Cabe salientar que a composição das defesas antioxidantes difere de tecido a tecido, de tipo de célula a tipo de célula e possivelmente de célula a célula do mesmo tipo, em um dado tecido. O sistema de defesa antioxidante está dividido em enzimático e não enzimático.

2.2.1.2.1 Sistema antioxidante enzimático

O sistema antioxidante enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx), de modo que o organismo mantém as concentrações de espécies reativas de oxigênio dentro dos limites fisiológicos (RIBEIRO et al., 2005).

A catalase desempenha importante papel na eliminação do H_2O_2 , promovendo a sua catálise até água (Figura 3).



Figura 3. Ação da enzima catalase (RIBEIRO et al., 2005).

A glutathiona redutase é uma flavoproteína dependente de NAD(P)H e da integridade da via das pentoses. É a enzima necessária para manter a glutathiona em sua forma reduzida e, possivelmente, para controlar o estado redox de NADP em tecidos onde GSSG está disponível. A recuperação de GSH por GR é uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular, pois, baixas concentrações de GSH estão associadas ao estresse oxidativo (VASCONCELOS, 2007).

Como citado por Ribeiro et al. (2005) a manutenção de níveis adequados de GSH é feita à custa da atividade da glutathiona redutase, a qual utiliza equivalentes redutores do NADPH para manter a glutathiona na forma reduzida, como substrato para glutathiona peroxidase (Figura 4).

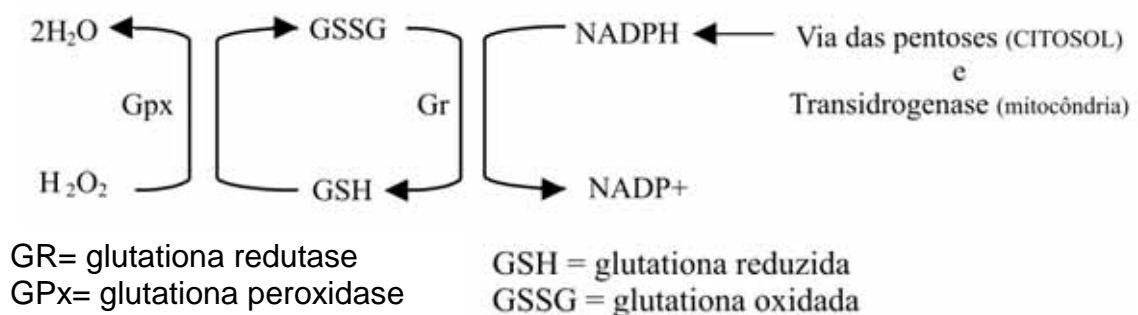


Figura 4. Sistema antioxidante enzimático (Ribeiro, 2005).

Assim, Ribeiro et al. (2005) citam ainda, a atuação eficiente de GPx exige um sistema enzimático sequencial que envolve glutathiona redutase e as enzimas que mantem níveis de NAD(P)H, nos compartimentos citosólicos.

Dessa forma, tanto a CAT quanto a GPx evitam o acúmulo de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio para que não haja produção de radical hidroxil, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa (RIBEIRO et al., 2005).

2.2.1.2.2 Sistema antioxidante não enzimático

O sistema não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo humano como bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q10, ácido úrico (SCHNEIDER, 2004). Além disso, diversos estudos já comprovaram que antioxidantes exógenos, obtidos dos alimentos, são essenciais para a

resistência ao estresse oxidativo. Esses antioxidantes são obtidos, sobretudo de produtos de origem vegetal: compostos fenólicos, vitamina E, vitamina C e carotenoides (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

2.2.2 Danos oxidativos causados pelas ERO

As ERO podem causar danos a todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios (peroxidação dos lipídios). O alvo celular primário pode variar, dependendo na célula, do tipo e da intensidade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

2.2.2.1 Peroxidação lipídica

A peroxidação de lipídios é definida como “a deterioração oxidativa de lipídios poli-insaturados”. Ácidos graxos poli-insaturados são aqueles que contêm duas ou mais duplas ligações carbono-carbono ($H_2C=CH_2$). Os ácidos graxos poli-insaturados são, devido a suas múltiplas duplas ligações, excelentes alvos para o ataque de radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

A peroxidação de lipídios é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes (Figura 5), onde L representa o lipídio (GARDÈS-ALBERT et al., 1991). A fase de iniciação representa o início da peroxidação, na qual o ácido graxo poliinsaturado sofre o ataque de uma espécie que é suficientemente reativa, como o radical hidroxila (OH^\bullet), para abstrair um átomo de hidrogênio (H) de um grupo metileno ($-CH_2-$), formando um radical centrado em carbono ($-\dot{C}H-$). Este radical sofre um rearranjo molecular formando um produto mais estável, o dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1994). Em meio aeróbico, o radical inicialmente formado combina-se com o oxigênio formando o radical peroxila (ROO^\bullet), o qual pode abstrair átomos de hidrogênio de moléculas lipídicas, gerando novos radicais peroxila e lipoperóxidos promovendo a etapa de propagação. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio abstraído gera um acúmulo de hidroperóxidos lipídicos ($ROOH$), que podem destruir a estrutura e função da membrana (WELCH et al., 2002). O processo de terminação consiste na aniquilação dos radicais formados originando produtos não radiculares (GARDNER, 1989; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

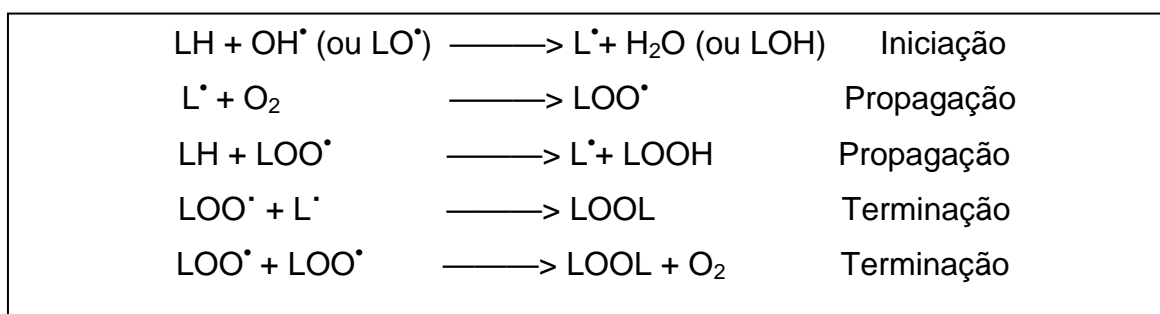


Figura 5. Etapas da peroxidação lipídica

A peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade contribui para a aterosclerose. As HDL são lipoproteínas de alta densidade, que removem o excesso de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, sendo considerado um agente que previne a aterosclerose. No entanto as HDL também podem sofrer lipoperoxidação (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

Os níveis dos produtos de fluidos biológicos e tecidos têm sido estudados extensivamente como potenciais biomarcadores do estresse oxidativo in vivo (DALLE-DONNE et al., 2006; LEE et al., 2008; YOSHIDA et al., 2008). Muitos estudos mostram a associação existente entre o aumento do estresse oxidativo e a peroxidação lipídica e o surgimento de doenças crônicas (DALLE-DONNE et al., 2006; BASU, 2008; LEE et al., 2009). Portanto, a lipoperoxidação in vivo pode ser relacionada como mecanismo subjacente no processo de envelhecimento e no desenvolvimento de diversas doenças crônicas.

2.3 Dieta hipercalórica e estresse oxidativo

A ingestão de uma dieta altamente calórica resulta num estado pós-prandial de hipertrigliceridemia, hiperglicemia e níveis elevados de ácidos graxos livres na circulação, gerando um estado de estresse oxidativo (ESPOSITO; GIUGLIANO, 2006). Hiperglicemia leva ao aumento na produção de ERO na mitocôndria, por aumentar o gradiente de prótons na membrana interna mitocondrial. Quando o gradiente excede o limiar, a transferência de elétrons no complexo III da cadeia respiratória é bloqueada, levando a um escape de elétrons da ubiquinona, com formação de ânion superóxido (CHOI et al., 2008). O aumento nos níveis de ácidos graxos livres nos tecidos e na circulação também relaciona o aumento de peso à produção aumentada de ERO. Ácidos graxos livres são conhecidos como ativadores

da produção de superóxido dependente de NAD(P)H oxidases em várias células, inclusive as fagocíticas (SCHÖNFELD; WOJTCZACK, 2008).

A estreita relação entre o aumento de peso corporal com aumentos paralelos no estresse oxidativo tem sido intensivamente pesquisada. Alterações tais como, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio nos depósitos de tecido adiposo, aumento da expressão de NAD(P)H oxidase e diminuição da expressão de enzimas antioxidantes podem ser vistas no aumento do peso corporal (LIMA, 2013).

Estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo está frequentemente associado e tem uma importante participação no desenvolvimento e manutenção da hipertensão. Ainda não está esclarecido se o estresse oxidativo causa a hipertensão, ou se a hipertensão promove o aumento desse evento nos tecidos cardiovasculares, renais, hepáticos e adiposos (VAZIRI; RODRIGUEZ-ITURBE, 2006). Dantas (2011) afirma que o estresse oxidativo e a hipertensão arterial participam de um ciclo de ativação e perpetuação de sinais que pode causar a progressão de doenças cardiovasculares.

2.4 Aditivos na indústria de alimentos

A incorporação de substâncias como aromatizantes, antiespumantes, antioxidantes, flavorizantes e espessantes na composição de formulações industriais é frequente em muitos processos produtivos (MAJOLO, 2013). Muitos alimentos produzidos em regiões longínquas necessitam frequentemente de aditivos para manter a sua qualidade. Além disso, a variedade e a apresentação dos alimentos são preocupações constantes das indústrias alimentícias. Estes fatores têm motivado as indústrias de alimentos a utilizarem quase que exclusivamente agentes químicos para conservar, colorir ou aromatizar os alimentos, com objetivo de atrair cada vez mais os consumidores (ANTUNES; ARAÚJO, 2000). Como afirma Majolo (2013), existe atualmente nas indústrias de alimentos uma forte tendência pela substituição de corantes e aditivos sintéticos por produtos naturais, por serem estes considerados seguros e menos susceptíveis a efeitos adversos como alergias e ocorrência de danos à saúde. Os corantes obtidos do urucum destacam-se neste cenário por apresentarem um amplo espectro de aplicação.

2.5 Urucum

Bixa orellana L. (Bixaceae), conhecida como urucuzeiro, é um arbusto com altura entre 2,0 a 4,0 m (Figura 6A), podendo atingir até 6,0 m dependendo das condições de clima e idade da planta. Seus frutos são cápsulas ovóides “cachopas”, cobertas por espinhos flexíveis, em cujo interior encontram-se de 30 a 50 sementes, conhecidas, popularmente, como urucum (Figura 6B), (SILVA, 2006).



Figura 6. A: urucuzeiro e B: cachopa com frutos e sementes expostas (urucum)

O corante do urucum é obtido através do extrato da camada resinosa externa das sementes (SILVA, 2006). O óleo essencial das sementes é rico em all-E-geranilgeraniol, monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados, além dos carotenoides bixina e norbixina (contendo em menor quantidade alfa e beta-caroteno). O uso do óleo das sementes de bixina na medicina é popular, principalmente para doenças coronarianas, afecções do estômago e intestino, afecções respiratórias, queimaduras, e como afrodisíaco (LORENZI; MATOS, 2008).

Nos últimos anos o potencial do mercado internacional do urucum teve um grande impulso. O pigmento extraído do urucum é um corante com ampla aplicação em diversos ramos industriais, principalmente no processamento de alimentos como sorvetes, queijos, manteigas e peixes defumados, sendo o segundo corante natural em importância econômica depois do caramelo (DOWNHAM; COLLINS, 2000). O cultivo do urucuzeiro destina-se exclusivamente a comercialização do corante presente na semente, podendo chegar ao máximo a 4,5 % em massa, nas sementes de boa procedência. A produção de pigmento, contudo, deixa a semente como subproduto. Esta semente foi avaliada por Lorenzi e Matos (2008) no sentido de tornar o cultivo desta espécie mais lucrativa, procurando, por exemplo, explorar a

sua possível aplicação como ração animal.

Sempre que se faz menção ao pigmento do urucum, maior atenção é dada à bixina por ser este o componente que ocorre em maior concentração, como também por ser o principal responsável pela sua cor vermelha (OLIVEIRA, 2005).

2.5.1 Bixina

A *cis*-bixina é o constituinte que ocorre em maior concentração no arilo da semente do urucuzeiro, representando cerca de 80% da bixina presente (OLIVEIRA, 2005).

A bixina possui uma cadeia isoprênica de 24 carbonos, contendo um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades, perfazendo assim a fórmula molecular $C_{25}H_{30}O_4$. Segundo Oliveira (2005), a bixina foi o primeiro *cis* carotenoide isolado a partir de fontes naturais. Na Figura 7 são apresentadas as estruturas moleculares da *trans* e *cis* bixina.

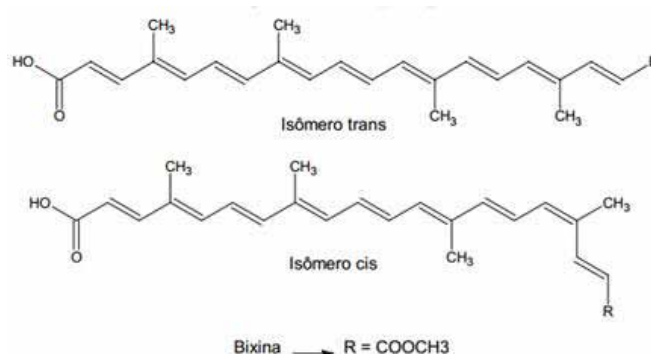


Figura 7. Estrutura do carotenoide bixina, *cis* e *trans* (OLIVEIRA, 2005).

Vários relatos da literatura têm associado o efeito antioxidante e hipolipidêmico da bixina com a proteção a órgão. Assim, Lima et al. (2001) induziram hiperlipidemia em coelhos, com uma dieta contendo colesterol. Acrescida a esta ração, foram testados os carotenoides bixina, norbixina e o flavonoide quercetina, todos provenientes da semente do urucuzeiro. Após 28 dias de tratamento, foi realizada a dosagem sorológica para determinação da lipoproteína alta densidade (HDL) e triglicérides. Os autores concluíram que a bixina apresentou a maior redução de colesterol (40%) em relação ao padrão, superior à redução obtida com a norbixina (25,35%) e quercetina (35,07%). Observaram ainda que a bixina apresentou a menor redução do HDL, sendo isto uma vantagem, visto que o HDL transporta o colesterol da circulação sanguínea para o fígado, onde é metabolizado.

Zhang et al. (1991) estudaram o efeito de inibição da peroxidação lipídica, avaliando alguns carotenos, entre eles, o beta-caroteno, a cantaxantina, a luteína, o alfa-tocoferol, o licopeno e a bixina, constatando a eficácia na inibição dos consequentes efeitos de transformações neoplásticas induzidas quimicamente. De todos os carotenoides testados, o alfa tocoferol foi o mais ativo inibidor da peroxidação lipídica, seguido pela bixina.

Em estudo realizado por Silva, Antunes, Bianchi (2001), no qual foi avaliado o efeito protetor da bixina contra os danos causados pela cisplatina, um dos agentes citotóxicos mais usados no tratamento de câncer, tendo efeitos colaterais graves como nefrotoxicidade, indução e aberrações cromossômicas, foram utilizadas duas doses de bixina via gavagem (2,5 e 5,0 mg/ kg de peso corporal), sendo que a maior dose mostrou-se mais efetiva na diminuição dos danos causados ao DNA e contra a lipoperoxidação.

Barcelos et al. (2012) encontraram resultados positivos quanto a proteção da bixina e norbixina contra os efeitos adversos causados pela exposição de ratos ao mercúrio orgânico no fígado e em células sanguíneas. Indicaram, ainda, a proteção contra os danos oxidativos provenientes desta exposição, pois houve uma elevação nos níveis de GSH e proteção dos danos ao DNA.

Moreira (2012) avaliou o efeito da bixina contra os danos hepáticos provocados pelo tetracloreto de carbono e também observou atividade protetora do órgão e a relacionou com a atividade antioxidante do carotenoide, pois houve proteção do estresse oxidativo provocado pela toxina com consequente inibição da lipoperoxidação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação ética

A Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) do Campus Experimental da UNESP de Dracena certificou que os procedimentos utilizando animais estão de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” (Protocolo nº. 43/2012).

3.2 Animais

Este experimento foi desenvolvido no delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e seis repetições para cada grupo. Foram utilizados nesse estudo ratos machos da linhagem Wistar com peso entre 200 e 240 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu. Os animais foram alojados no biotério do Campus de Dracena, em caixas de polipropileno, em ambiente controlado com temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ com ciclo de luz de 12 h, receberam alimentação (Figura 8) e água *ad libitum* e, após um período de adaptação de 7 dias, foram divididos aleatoriamente de acordo com cada tratamento, por oito semanas:

- Grupo 1 (Controle - “C”) recebeu dieta padrão com ração comercial.
- Grupo 2 (Controle Bixina - “CB”) recebeu ração comercial com bixina (5% do total de ração).
- Grupo 3 (Dieta Hipercalórica - “H”) recebeu dieta hipercalórica.
- Grupo 4 (Dieta Hipercalórica + Bixina – “HB”) recebeu dieta hipercalórica misturada à bixina (5% do total de ração).

3.3 Dieta hipercalórica

A dieta Hipercalórica foi preparada de acordo com Santos; Vianna, (2007):

- 60% de ração padrão triturada;
- 25% de gordura hidrogenada comercial, derretida em micro-ondas para melhor homogeneização;
- 15% de leite condensado comercial.

Após a homogeneização, a pasta foi peletizada e seca em estufa a 60°C por 48 horas. O armazenamento foi feito em freezer a -18°C , em pequenas porções, para que o descongelamento fosse feito conforme a necessidade.

Para a produção da dieta hipercalórica + bixina (HB):

- A bixina em pó (26%) foi dissolvida na gordura hidrogenada e misturada à dieta H até a obtenção de uma cor uniforme.

Tabela 1. Comparação da dieta padrão e hipercalórica (H) em 100 g

Componente	Ração Hipercalórica	Ração Comercial
Ração Probiotério MP77 (g)	60,0	100,0
Leite Condensado (g)	15,0	-
Gordura Hidrogenada (g)	25,0	-
Carboidrato (%)	34	43,5
Proteína (%)	14,0	13,0
Gordura (%)	27,0	3,0
Energia (kcal/100g)	435	253

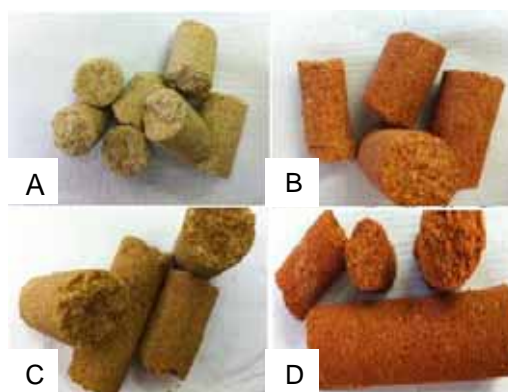


Figura 8. Fotos das rações: A: dieta padrão (C); B: dieta controle + bixina (CB); C: dieta hipercalórica (H); D: dieta hipercalórica + bixina (HB).

3.4 Obtenção da bixina

A bixina em pó (26%) foi obtida por meio de doação da empresa Christian Hansen Indústria e Comércio Ltda (Valinhos, SP, Brasil).

3.5 Eutanásia

Após oito semanas de tratamento, o método utilizado para a anestesia dos animais foi o éter dietílico por inalação. Após a anestesia, então, fez-se a decapitação.

3.6 Análises bioquímicas

Após a eutanásia, foram avaliados os seguintes parâmetros bioquímicos: concentração de colesterol total e triglicérides, atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no soro sanguíneo; atividade das enzimas glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx),

concentração de glutathiona reduzida (GSH), estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H), além da peroxidação dos lipídios de membrana no homogenato de fígado.

3.6.1 Análises de colesterol total e triglicérides

O sangue dos animais dos quatro grupos foi colhido individualmente em tubos tipo “Falcon” de 15 mL, e mantido em temperatura ambiente por 15 minutos para coagulação. O soro foi separado por centrifugação, com velocidade de 3000 g por 15 minutos. As concentrações de colesterol total e triglicérides foram dosadas por meio de kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram apresentados em mg/dL.

3.6.2 Análise das enzimas indicadoras de funções hepáticas

A atividade das enzimas indicadoras de funções hepáticas (ALT e AST) foi dosada no soro sanguíneo por meio de kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram apresentados em U/L.

3.6.3 Preparação do homogenato de fígado de rato

Após a eutanásia dos animais o fígado foi retirado e colocado em aproximadamente 50 mL de meio contendo sacarose 250 mM, EGTA 1 mM e HEPES 10 mM com pH 7,2 a 4°C, picotado e levado para um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjen e homogeneizado 3 vezes por 15 s com intervalos de 1 minuto.

A determinação de proteína foi realizada através da reação do biureto, de acordo com Cain; Skilleter (1987) usando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.6.3.1 Determinação da concentração de GSH

A determinação da concentração de GSH no homogenato do fígado foi realizada de acordo com Hissin e Hilf (1976) utilizando-se tubos do tipo “eppendorf” de 2 mL. Colocado o homogenato (1mg de proteína/mL) adicionou-se meio contendo sacarose 125 mM, KCl, 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4 para completar 1 mL e após uma leve homogeneização, foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético 13%. A mistura foi agitada e centrifugada a 9000 g por 3 min. Em

tubos de ensaio de 5 mL foram adicionados 1800 μ L de tampão contendo NaH_2PO_4 0,1 M, pH 8,0, com EDTA 5 mM, 100 μ L do sobrenadante obtido da centrifugação e 100 μ L de OPT (o-ftalaldeído) 1 mg/mL. Em seguida, os tubos foram agitados e mantidos por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Foi efetuada a leitura em espectrofluorímetro RFPC 5301 (Shimadzu, Japão) com comprimento de onda de 350 e 420 nm para emissão e excitação, respectivamente, com abertura de fenda 3 em ambos os casos. Os dados foram representados em nmol/mg de proteína.

3.6.3.2 Determinação do estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)

O estado oxidativo do NAD(P)H foi avaliado espectrofluorimetricamente. Em cubeta de quartzo de 4 mL foi adicionado meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, EGTA 0,5 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2 e homogenato do fígado (1 mg de proteína/mL, volume final 2 mL). Em seguida, foi determinada a fluorescência em espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tokyo, Japão) com comprimento de onda de 366 e 450 para excitação e emissão, respectivamente. Os dados foram representados em unidades relativas de fluorescência.

3.6.3.3 Atividade da enzima glutathiona redutase (GR)

Em cubeta de quartzo de volume de 4 mL foram adicionados, 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mM, pH 7,6, contendo EDTA 0,5 mM, 10 μ L de triton X-100 a 10%, homogenato do fígado (1 mg de proteína) e 10 μ L de GSSG 100 mM. Em seguida as amostras foram incubadas a 30°C por 5 minutos. Logo após foram adicionados 10 μ L de NAD(P)H 10 mM e a variação da absorvância foi determinada no comprimento de onda de 340 nm em um espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800 (Fullerton, CA, USA). Os dados foram expressos em mU/mg de proteína.

3.6.3.4 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

Em cubeta de quartzo de volume de 4 mL foram adicionados, 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mM, pH 7,6, contendo EDTA 0,5 mM, 10 μ L de triton X-100 a 10%, homogenato do fígado (1 mg de proteína), 5 μ L de GSH 100 mM e 20 μ L de NAD(P)H 10 mM. Após 1 minuto de incubação, foram adicionados 10 μ L de H_2O_2 25 mM e a variação da absorvância foi determinada no comprimento de onda de 340

nm em espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800 (Fullerton, CA, USA). Os dados foram expressos em mU/mg de proteína.

3.6.3.5 Avaliação da peroxidação de lipídios de membrana

A peroxidação de lipídios de membrana foi determinada utilizando o método do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Para tanto, 5 mg de homogenato do fígado foram colocados em tubo de ensaio e foram adicionados 0,2 mL de SDS (8,1%), 1,5 mL de ácido acético (20%), 1,5 mL de TBA (solução aquosa a 0,67%), o volume foi completado até 4 mL com água deionizada (milli-Q) e a mistura foi colocada em banho-maria a 95°C por 60 min. Após o período de incubação os tubos foram retirados e resfriados em banho de gelo e adicionado 1 mL de água milli-Q e o complexo MDA-TBA extraído com 5 mL de n-butanol. Em seguida os tubos foram centrifugados a 2000 g por 10 minutos, a parte orgânica foi coletada e a absorvância foi medida a 535 nm. A concentração de malondialdeído (MDA) foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os dados foram expressos em nmol/mg de proteína.

3.7 Análise estatística

A significância estatística dos dados experimentais foi determinada pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey, sendo considerados estatisticamente significantes resultados com valores de $P < 0,05$. As análises foram realizadas aplicando o programa GraphPad Prism, versão 4.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA 03/04/2003).

4. RESULTADOS

4.1 Análise de variação de peso dos ratos

Conforme apresentado na Figura 9, não houve diferença significativa entre o ganho de peso dos animais durante todo o tratamento com a dieta hipercalórica em relação ao controle. Pode-se observar, ainda, que o ganho de peso dos animais controle foi maior que os tratados.

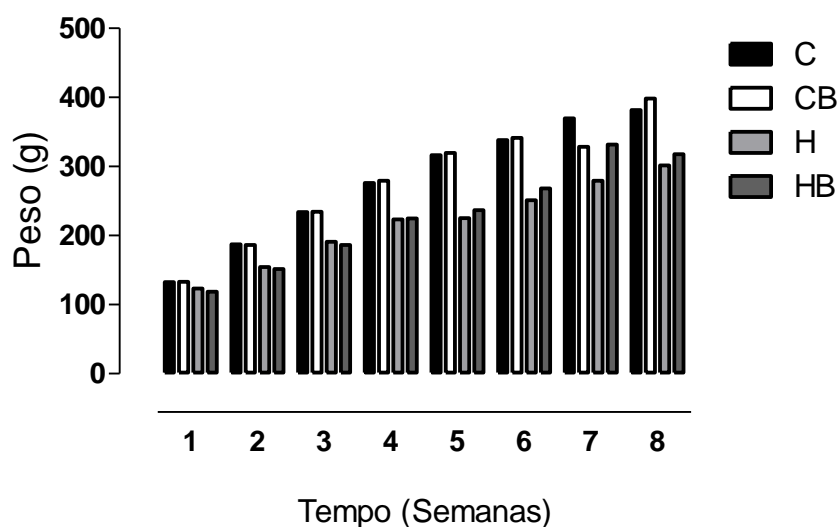


Figura 9. Análise da variação de peso dos ratos. Os resultados representam a média de 6 animais por grupo. C = controle; CB = controle bixina; H = dieta hipercalórica; HB = dieta hipercalórica + bixina.

4.2 Análise das concentrações de colesterol e triglicérides

Conforme observado na Figura 10 A, o tratamento com dieta hipercalórica promoveu um aumento significativo na concentração sérica de colesterol, porém a bixina não teve efeito protetor sobre esse parâmetro. Em relação à produção de triglicérides (Figura 10 B) não houve diferença significativa entre os grupos estudados, embora uma tendência de aumento possa ser observada no grupo tratado com dieta hipercalórica.

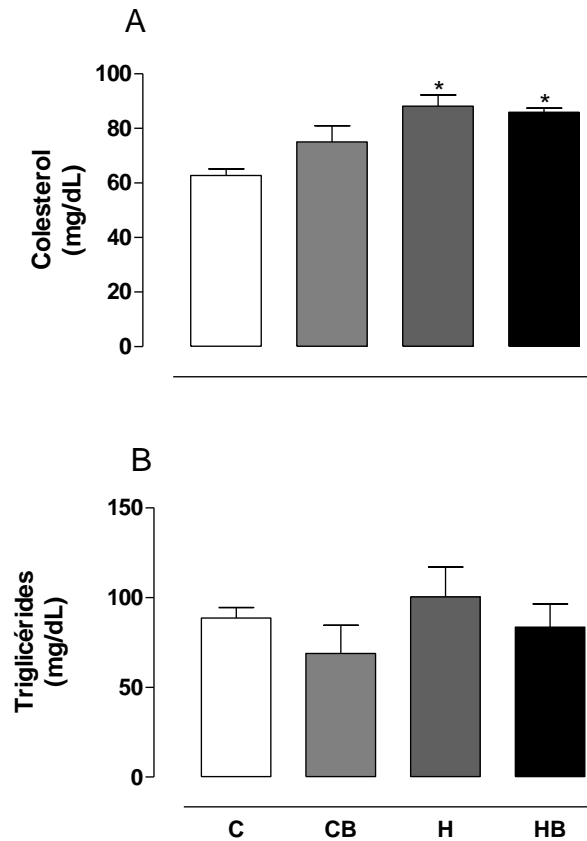


Figura 10. Análise das concentrações de colesterol e triglicérides no soro sanguíneo dos ratos. Os resultados representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. C = controle; CB = controle bixina; H = dieta hipercalórica; HB = dieta hipercalórica + bixina. *Significativamente diferente do controle (C) ($P < 0,05$).

4.3 Atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)

A Figura 11A mostra que o tratamento com dieta hipercalórica promoveu um aumento significativo da atividade sérica da ALT em relação ao controle. A comparação entre os grupos H e HB mostram que o tratamento concomitante com a bixina protegeu o fígado dos danos provocados pela dieta hipercalórica, uma vez que os resultados obtidos para esses grupos foram significativamente diferentes.

Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para a atividade sérica da AST (Figura 11B).

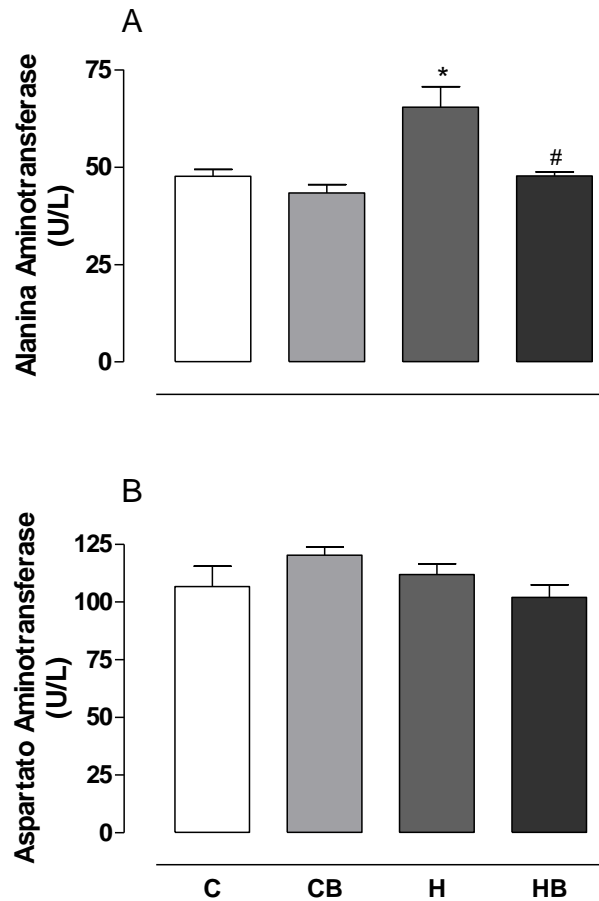


Figura 11. Atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) (A) e aspartato aminotransferase (AST) (B) no soro sanguíneo dos ratos. Os resultados representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. C = controle; CB = controle bixina; H = dieta hipercalórica; HB = dieta hipercalórica + bixina. *Significativamente diferente do controle (C) ($P < 0,05$). #Significativamente diferente do tratado com dieta hipercalórica (H) ($P < 0,05$).

4.4 Determinações das concentrações de GSH no homogenato

De acordo com a Figura 12 os animais submetidos à dieta hipercalórica tiveram alteração nos níveis de GSH presente no homogenato. O tratamento concomitante dos animais com a bixina (HB) não protegeu o fígado do efeito provocado pela dieta hipercalórica com relação a esse parâmetro.

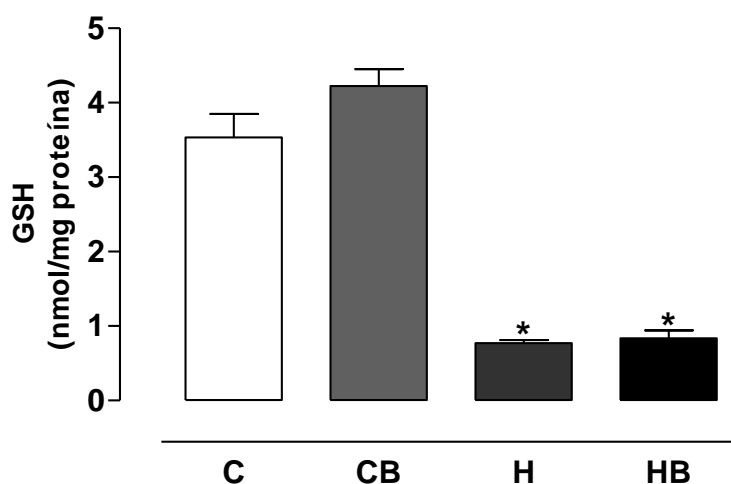


Figura 12. Concentração de glutatona reduzida (GSH) no homogenato do fígado dos ratos. Os resultados representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. C = controle; CB = controle bixina; H = dieta hipercalórica; HB = dieta hipercalórica + bixina. *Significativamente diferente do controle (C) ($P < 0,05$).

4.5 Determinações do estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina NAD(P)H

De acordo com a Figura 13 o estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina NAD(P)H no grupo tratado com dieta hipercalórica foi significativamente menor em relação ao controle, demonstrando que a dieta hipercalórica promoveu a oxidação dos compostos. O tratamento concomitante dos animais com a bixina não protegeu o fígado do efeito provocado pela dieta.

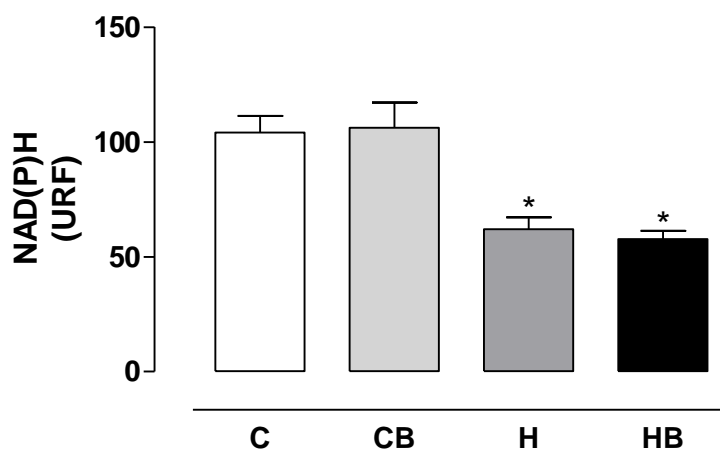


Figura 13. Determinação do estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina NAD(P)H no homogenato do fígado dos ratos. Os resultados representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. C = controle;

CB = controle bixina; H = dieta hipercalórica; HB = dieta hipercalórica + bixina. *Significativamente diferente do controle (C) ($P < 0,05$).

4.6 Atividade das enzimas glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx)

A análise da atividade da enzima glutatona redutase demonstrou que houve uma redução significativa no grupo tratado com dieta hipercalórica em relação ao controle. O tratamento concomitante dos animais com a bixina (HB) protegeu contra o efeito provocado pela dieta sobre a atividade da enzima (Figura 14A). Resultados semelhantes foram observados na atividade da enzima glutatona peroxidase (Figura 14B).

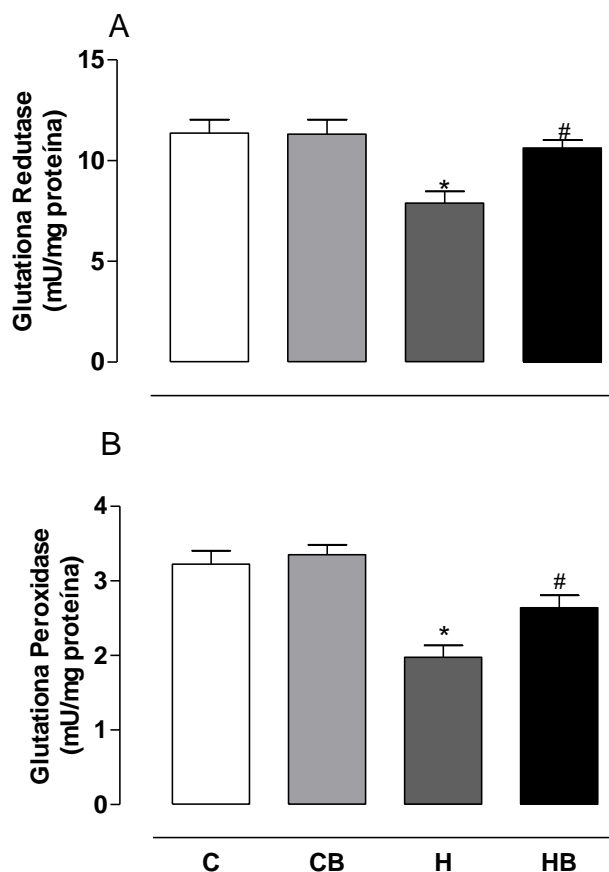


Figura 14. Atividade das enzimas Glutathione redutase (GR) (A) e Glutathione Peroxidase (GPx) (B) no homogenato do fígado dos ratos. Os resultados representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. C = controle; CB = controle bixina; H = dieta hipercalórica; HB = dieta hipercalórica + bixina. *Significativamente diferente do controle (C) ($P < 0,05$). #Significativamente diferente do tratado com dieta hipercalórica (H) ($P < 0,05$).

4.7 Peroxidação dos lipídios de membrana

Os resultados apresentados na Figura 15 demonstram que o tratamento dos animais com dieta hipercalórica promoveu um aumento significativo na concentração de malondialdeído (MDA) em relação ao grupo controle, indicando uma maior peroxidação dos lipídios de membrana. O tratamento concomitante com a bixina protegeu o fígado da peroxidação lipídica provocada pela dieta.

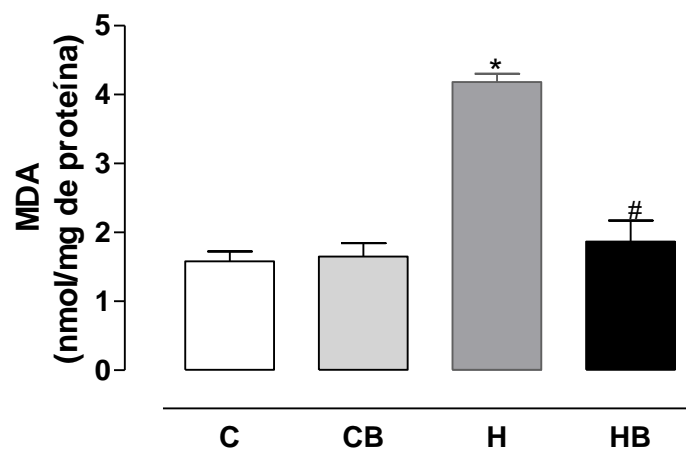


Figura 15. Concentração de malondialdeído (MDA) no homogenato do fígado dos ratos. Os resultados representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. C = controle; CB = controle bixina; H = dieta hipercalórica; HB = dieta hipercalórica + bixina. *Significativamente diferente do controle (C) ($P < 0,05$). #Significativamente diferente do tratado com dieta hipercalórica (H) ($P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos têm estabelecido a importância de fatores dietéticos no desenvolvimento de doenças cardiovasculares em homens e animais, evidenciando uma relação direta com o nível de lipídios no sangue. Por outro lado, existe uma relação inversa entre o risco de câncer e hiperlipidemias e o consumo de alimentos contendo carotenoides, demonstrando-se ação anticancerígena e hipolipidêmica (SILVA et. al. 2001). Além disso, diversos estudos já comprovaram que antioxidantes exógenos, obtidos dos alimentos, são essenciais para a resistência ao estresse oxidativo. Esses antioxidantes são obtidos, sobretudo de produtos de origem vegetal: compostos fenólicos, ácido ascórbico e carotenóides (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

No presente estudo, contrariamente a Santos e Vianna (2007) não foi observado aumento de peso significativo nos grupos tratados com dieta hipercalórica, provavelmente porque a suplementação empregada foi baseada em gordura hidrogenada, o que leva a acreditar que houve uma rejeição ocasionada por uma baixa palatabilidade.

Santos e Vianna (2007) relataram a importância não somente da quantidade de lipídios na dieta, mas a qualidade dos mesmos. Os autores confirmaram experimentalmente a exacerbação da hipertensão arterial por dieta hipercalórica e hiperlipídica em ratos, e a influência dos componentes dessa dieta nesse processo, independentemente da quantidade de ração consumida.

As dislipidemias estão intimamente relacionadas com o aumento das concentrações de colesterol e/ou triglicérides (LIMA, 1999), desta forma, avaliou-se a influência da alimentação hipercalórica nestes parâmetros.

A eficácia da dieta hipercalórica usada neste estudo com relação ao aumento dos níveis séricos de lipídios assemelha-se ao trabalho de Almeida et al. (2011), que embora tenham observado aumento significativo nos níveis de colesterol total, também não observaram aumento nos níveis de triglicérides usando dieta com 8% de óleo de milho e 46% de leite condensado. A bixina não apresentou efeito hipocolesterolêmico, embora dados da literatura tenham indicado sua eficácia em reduzir os níveis séricos de colesterol (MACIEL, 2008; LIMA et al., 2001, 2003, 2010).

O aumento da atividade sérica da enzima ALT nos animais tratados com dieta hipercalórica comparada aos grupos controle com e sem bixina, indicaram a eficiência da dieta na indução de danos hepáticos e ainda, a observação de uma diminuição no grupo tratado com bixina concomitantemente à dieta hipercalórica, permitiu evidenciar o efeito protetor da mesma, visto que, segundo Al-Habori e Stahmann (2002) e Motta (2003), esta enzima é, primariamente, limitada ao citosol dos hepatócitos, e é considerada uma indicadora altamente sensível de dano hepatocelular e ainda, dentro de certos limites, pode fornecer uma taxa quantitativa do grau de dano sofrido pelo fígado.

Quanto à atividade sérica de AST, não foram observadas alterações entre os grupos indicando que a lesão hepática promovida pela dieta hipercalórica foi apenas em nível citosólico, não afetando as mitocôndrias. Segundo Lima (1999), em doenças hepáticas, elevações pequenas de ambas, ou apenas de ALT em pequena

proporção, são encontradas na hepatite crônica (especialmente hepatite C e esteato-hepatite não alcoólica). Desta forma, a determinação simultânea das duas enzimas fornece uma clara indicação da provável localização da lesão tecidual.

O tratamento com dieta hipercalórica afetou o sistema antioxidante no fígado dos ratos como indicado pela diminuição na concentração de GSH, no estado oxidativo de NAD(P)H e na atividade das enzimas glutathiona redutase (GR) e peroxidase (GPx). Esses resultados estão de acordo com o observado por Diniz et al., 2004 que demonstraram o envolvimento do estresse oxidativo nas alterações metabólicas provocadas pela dieta hipercalórica no fígado. Esse efeito pode levar ao estresse oxidativo e induzir a lipoperoxidação, iniciar danos dos radicais livres à membrana hepatocelular e levar à lesão hepática (FERREIRA; MATSBURA, 1997; JORDÃO JUNIOR, 1998). Embora o tratamento com a bixina não tenha sido eficaz na proteção contra a oxidação de GSH e NAD(P)H, o carotenoide atuou de maneira positiva mantendo a atividade das enzimas antioxidantes GR e GPx no mesmo nível do grupo controle.

Glutathiona peroxidase (GPx) converte peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água, oxidando a GSH ao seu correspondente dissulfeto (GSSG). GSH é regenerada pela glutathiona redutase por intermédio da oxidação de NAD(P)H (ABUJA; ALBERTINI, 2001). Portanto, os resultados indicaram que o peróxido de hidrogênio e o estresse oxidativo tem um papel importante nas alterações hepáticas induzidas pela ingestão de dieta hipercalórica.

A extensão da peroxidação de lipídios pode ser determinada pela dosagem do produto final malondialdeído (MDA). Os resultados obtidos na avaliação da concentração de MDA mostram que houve aumento significativo desta substância no homogenato do fígado dos ratos tratados com a dieta hipercalórica comparada ao controle, indicando que houve indução da lipoperoxidação, e ainda, que o tratamento com bixina foi eficaz na proteção contra este efeito, pois houve diminuição dos níveis de MDA. Este resultado está de acordo com os apresentados por Moreira (2012), que demonstrou que a bixina protegeu o fígado de ratos tratados com tetracloreto de carbono, e que esta proteção estava relacionada com sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica. Essa atividade da bixina poderia ser atribuída a uma habilidade scavenger (capacidade de neutralizar os radicais livres formando compostos menos reativos) de radical peroxil formado durante a oxidação dos lipídios de membrana

como descrito para outros carotenoides como o β -caroteno (BURTON; INGOLD, 1984).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a bixina pode proteger o fígado dos danos causados por uma dieta hipercalórica, uma vez que ela evitou a liberação da enzima ALT no soro e manteve a atividade das enzimas antioxidantes glutatona redutase e glutatona peroxidase e ainda, reduziu a peroxidação dos lipídios de membrana, desta forma seu uso terapêutico poderia ser considerado em situações clínicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUJA, P.M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clin. Chim. Acta**, v. 306, n.1-2, p.1-17, 2001.

AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, p. 209-217, 2002.

ALMEIDA, M.E.F. et al. Efeitos do estresse auditivo e da dieta hipercalórica sobre o peso corporal, lipídios e glicemia de ratos *Wistar*. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 22, n. 3, p. 359-365, 2011.

ANTUNES NETO, J.M.F.; PAULA, L.B. Índices de estresse oxidativo em sujeitos com diferentes níveis de composição corporal e aderência a prática de atividade física. **Braz. Jour. of Biometric.**, v. 5, n. 2, p. 117-131, 2011.

ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.13, p. 81-88, 2000.

BARCELOS, G.R.M. et al. Bixin and norbixin protect against DNA-Damage and alterations of redox status induced by methylmercury exposure in vivo. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 53, n. 7, supl. 4, part 1-2, p. 535-541, 2012.

BASU, S. F2-isoprostanes in human health and diseases: from molecular mechanisms to clinical implications. **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 10, p. 1405-1434, 2008

BAUTISTA, A.R. et al. Subacute toxicity assessment of annatto in rat. **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, p. 625-629, 2004.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem. J.**, v.134, p.707-716, 1973.

CABEÇO, L.C. et al. Dieta hiperlipídica com farinha de soja como fonte proteica: utilização na seleção de ratos propensos e resistentes à obesidade. **Rev. Nutr.**, v.23, n.3, p. 417-424, 2010.

CARRARA, A.P.B. Dieta hipercalórica: um desafio para a saúde pública. **Rev. Inst. Ciência Saúde**, v. 26, n. 3, p. 299-303, 2008.

CHAVES, G.V. et al. Associação entre DHGNA e marcadores de lesão/função hepática com componentes da sm em indivíduos obesos classe III. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v. 58, n. 3, p. 288-293, 2012.

CHOI, S. et al. Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? **Free Radic. Biol. Med.** v. 44, p. 1217-1231, 2008.

COELHO, A.M.S.P. et al. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). **Revista Lecta**, v. 21, p.47-54, 2003.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin. Chem.**, v. 52, p. 601-623, 2006.

DANTAS, A.C.S. **Impacto da ovariectomia sobre alterações metabólicas e inflamatórias em modelos de obesidade induzida por dieta em ratas.** 82f. il. 2011. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2011. Disponível em:<[https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/10442/1/2011%20Mestrado%20PMPGC F%20-%20ACSD.pdf](https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/10442/1/2011%20Mestrado%20PMPGC%20-%20ACSD.pdf)>. Acesso em: 13 de out. de 2013.

DANTAS, J.A. et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do biotério central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci. Health Sci.**, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **Internat. J. Food Sci. Technol.**, v.35, n.1, p.5-22, 2000.

ESPOSITO, C.; GIULIANO, D. Diet and inflammation: a link to metabolic and cardiovascular diseases. **Europe. Heart Jour.**, v.27, p. 15-20, 2006.

FERREIRA, A.L.; MATSUBARA, L.S. Os radicais Livres: Conceitos, Doenças relacionadas, Sistema de Defesa e Estresse Oxidativo. **Rev. Ass. Med. Bras**, São Paulo, v.43, n. 1, p. 61- 68, 1997.

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. **Current. Opinion. in Cell Biology**, v. 15, p. 247-254, 2003.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

GARDÈS-ALBERT, M.; JORE, D.; FERRADINI, C. Membrane lipid peroxidation: pulse and g-radiolysis in oxyradical research. In: VIGO-PELFREY, C. (Ed). **Membrane Lipid Oxidation**. Santa Clara: CRC Press, 1991. p.2-30.

GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radical Biol. Med.**, v. 7, p. 65-86, 1989.

GONÇALVES, M.C.R. et al. Berinjela (*Solanum melongena* L.) – mito ou realidade no combate as dislipidemias? **Rev. Bras. de Farmacologia**, v. 16, n. 2, p. 252-257, 2006.

GUILLOUZO, A. Liver cell models in vitro toxicology. **Environ. Health Perspect.**, v. 106, n. 2, p. 511-532, 1998.

GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinic. Chemist.**, v. 41, n. 12, p.1819 -1828, 1995.

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. Antioxidants in nutrition, health, and disease. **Oxford**: 1994.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, **Am. J. Clin. Nutr.**, v.57, n.5, p.715S-724S, 1993.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Braz. Jour. Pharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FATIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quím. Nova**, v.31, n.5, p. 1170-1179, 2008.

HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem.**, v. 74, n. 1, p, 214-26, 1976.

JORDÃO JUNIOR, A.A.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M.S.M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 434-449, 1998.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, p. 244-282, 2007.

LEE, C.J.; SEET, R.C.S.; HUANG, S.H. Different patterns of oxidized lipid products in plasma and urine of Dengue fever, stroke, and Parkinson's disease patients: cautions in the use of biomarkers of oxidative stress. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 11, p. 407-420, 2009.

LIMA, F.E.L.; MENEZES, T.N.; TAVARES, M.P.; SZARFARC, S.C.; FISBERG, R.M. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. **Rev. Nutr.**, v. 13, n.2, p. 73-80, 2000.

LIMA, J.C.C. As dislipidemias e suas avaliações laboratoriais. **HiperAtivo**, v. 2, p. 133-137, 1999.

LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T. J. Efeitos do flavonoide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. **Rev.Nutr.** v.16, n. 3, p. 305-314, 2003.

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

LIMA, R.M. Obesidade: o mal do século. **Perspec. Online**, v.1, n.2, p. 86-99, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2. ed. **Nov. Odessa: Inst. Plantarum**, 2008.

LUDUVING, M.M. Conheça os inimigos do colesterol. **Rev. Saúde! É vital!**, São Paulo Azul, p. 169, 1997.

MACIEL, A.M. **Efeitos do tratamento com torta de bixina nas defesas antioxidantes e perfil lipídico em hamsteres submetidos às dietas padrão e hipercolesterolemiantes**. 2008. 35 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. Disponível em: <http://www.livrosgratis.com.br/arquivos_livros/cp059983.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2013.

MAJOLO, C.; CARVALHO, H.H.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana “in vitro” de diferentes acessos de urucum (*Bixa orellana* L.) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 31, n. 1, p. 115-124, 2013.

MALHEIROS, S.V.P. Integração metabólica nos períodos pós-prandial e de jejum – um resumo. **Rev. Bras. Ens. Bioq. Biol. Mol.**, n.6, p. C1-C7, 2006.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. Cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. In: MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. Cap. 11, p. 132-155.

MOREIRA, P.R. **Atividade antioxidante da bixina sobre danos causados pelo tetracloreto de carbono no fígado de ratos**. 2012. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de São Paulo, Araçatuba.

MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 4 ed., [S.I.]: Médica Missau, 2003.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 31, n.11, p. 1287-1312, 2001.

PALOZZA, P.; KRINSKY, N. I. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: An overview. **Methods Enzymol.**, v. 213, p. 403-420, 1992.

PARENTE, E.B. et al. Perfil Lipídico em crianças obesas: efeitos da dieta hipocalórica e atividade física aeróbica. **Arq. Bras. Endocrino Metab.**, v. 50, 2006.

PARKER, R.S. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. **FASEB J.**, v. 10, p. 542-551, 1996

PEDROSA, J. P.; CIRNE, L. E. M. R.; NETO, J. M. M. Teores de bixina e proteína em sementes de urucum em função do tipo e do período de armazenagem. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, Campina Grande, PB, DEAg/UFPB. v. 3, n. 1, p. 121-123, 1999.

RIBEIRO, S.M.R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci. J.**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

ROUILLER, C.H. Experimental toxic injury of the liver. In: ROUILLER, C.H. (ed). **The liver**, v.2. New York: Academic Press, 1964. p.335-476.

SANTOS, R.S.; VIANNA, L. M. High-calorie and high-fat diet increases arterial hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr./J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, v. 32, n. 1, p. 1-9, 2007.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SCHINONI, M.I. Fisiologia hepática. **Gaz. méd. Bahia**, v. 76, n.1, p. S5-S9, 2006.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Ver. Bras. Med. Esporte**, v.10, n.4, p. 308-313, 2004.

SCHÖNFELD, P.; WOJTCZACK, L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 45, p. 231-241, 2008.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SILVA R.R. et al. Curcumina e norbixina: ação no metabolismo lipídico de aves domésticas. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 34, p. 177-182, 2001.

SILVA, C.A.N.; BRAGA, S.F.P; SILVA, A.G. Urucum, *Bixa orellana* L. (Bixaceae) – um agente importante na regulação de dislipidemias? **Natureza on line**, v. 4, n. 2, p. 72-76, 2006.

SILVA, C.R.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 43, n.6, p. 561-566, 2001.

SILVA, F.O. **Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante dos carotenoides totais extraídos do músculo de camarões cultivados *Litopenaeus vannamei***. 2010. 123 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Programa de Pós Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/93996/280437.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 30 de out. de 2013.

SILVA, M.L.C. et al. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciênc. Agr.**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, V.R.G. **Marcadores Pró-inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes submetidos à gastroplastia com by-pass em Y de Roux**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Programa de Pós Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em: <[http://ppgn.ufsc.br/files/2009/09/Disserta%C3%A7%C3%A3o-Vivian^eRdrigues-Gon%C3%A7alves-da-SILVA.pdf](http://ppgn.ufsc.br/files/2009/09/Disserta%C3%A7%C3%A3o-Vivian%eRdrigues-Gon%C3%A7alves-da-SILVA.pdf)>. Acesso: 16 ago. 2013.

SOUZA, L.F. **Ação antioxidante de compostos bioativos do urucum – Bixina**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/29547/000776987.pdf?sequence=1>>. Acesso: 20 de set. de 2013.

TOLMAN, K.G.; SIRRINE, R.W. Occupational hepatotoxicity. **Clin. Liver Dis.**, v. 2, p.563, 1998.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova.**, v.30, n.5, p. 1323-1338, 2007.

VAZIRI, N.D.; RODRIGUEZ-ITURBE, B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. **Nat. Clinical Pract. Nephrol.**, v. 2, p. 582-593, 2006.

WELCH, K.D.; DAVIS, T.Z.; VAN EDEN, M.E. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 32, p. 577-583, 2002.

YOSHIDA, Y.; KODAI, S.; TAKEMURA, S. Simultaneous measurement of F2-isoprostane, hydroxyoctadecadienoic acid, hydroxyeicosatetraenoic acid, and hydroxycholesterols from physiological samples. **Anal. Biochem.**, v. 379, p. 105-115, 2008.

ZARIPHEH, S.E.J.W. Factors that influence the bioavailability of xanthophylls. **J. Nutr.**, v. 132, p. 531S-534S, 2002.

ZHANG, L.X.; COONEY R. V.; BERTRAM J. S. Carotenoids Gap Junction Communication and Inhibit Lipid Peroxidation in C3H/10T1/2 Cells: Relations to Their Cancer Chemopreventive Action. **Carcinogenesis**, v 12, p. 2109-2114, 1991.

ZIMMERMAN, H.J. Drug-induced liver disease. In: SCHIFF, E.R., SORREL, M.F., MADDREY, W.C. **Diseases of the liver**. Philadelphia: JB Lippincott, 1998. p.973-1964.