

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA BIXINA SOBRE OS DANOS
CAUSADOS PELO TETRACLORETO DE CARBONO NO FÍGADO
DE RATOS**

Priscila Rodrigues Moreira
Fisioterapeuta

ARAÇATUBA - SP
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA BIXINA SOBRE OS DANOS
CAUSADOS PELO TETRACLORETO DE CARBONO NO FÍGADO
DE RATOS**

Priscila Rodrigues Moreira
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
2012



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



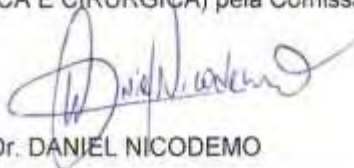
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Atividade antioxidante da bixina sobre os danos causados pelo tetracloreto de carbono no fígado de ratos

AUTORA: PRISCILA RODRIGUES MOREIRA

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.



Dr. DANIEL NICODEMO



Dr. CECÍLIO VIEGA SOARES FILHO



Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

DATA DA REALIZAÇÃO: 12 de novembro de 2012.



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

Catálogo na Publicação
Biblioteca do Campus de Dracena - UNESP

M838a Moreira, Priscila Rodrigues.

Atividade antioxidante da bixina sobre danos causados
pelo tetracloreto de carbono no fígado de ratos / Priscila
Rodrigues Moreira - Araçatuba : [s.n.], 2012
45 f. : il. + 1 CD-ROM

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

Orientador: Prof. Fábio Erminio Mingatto

1. Agentes oxidantes. 2. Hepatotoxicologia. 4. Radicais
livres (Química). 3. Antioxidantes. 5. Urucum.

CDD 541.224

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PRISCILA RODRIGUES MOREIRA- nascida em Penápolis (SP) no dia 17 de agosto de 1985, ingressou no curso de bacharelado em Fisioterapia pelo Unisalesiano - Campus de Araçatuba (SP) em fevereiro de 2004, obtendo o título de fisioterapeuta em dezembro de 2007. Em fevereiro de 2008, ingressou na pós-graduação e residência pela Faculdade de Medicina de São José do Rio preto (Famerp) em São José do Rio Preto, onde em dezembro de 2009 obteve o título de pós graduação em Fisioterapia Hospitalar. Esteve envolvida em atividades de pesquisa de janeiro a julho de 2010, desenvolvendo pesquisas em Fisiopatologia do tecido ósseo. Ingressou no curso de Mestrado em Ciência Animal pela UNESP, Campus de Araçatuba (SP), em agosto de 2010 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. Concluiu o mestrado em novembro de 2012.

*Sem sonhos, a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.
Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos
para executar seus sonhos.
Melhor é errar por tentar do que errar por omitir!"*

Augusto Cury

DEDICO:

Aos meus pais e à minha querida irmã, que sempre me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos. Dedico especialmente esta dissertação ao meu exemplo de vida acadêmica, Dr. Fábio Ermínio Mingatto, que sempre me estimulou dar este grande passo.

Meus pais e meu orientador são pessoas com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação e sempre estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por serem corretos e competentes, minha fonte de inspiração, apoio e ensino diário.

Agradeço sempre a Deus por ter colocado vocês em minha vida.

Agradecimentos

Agradecer a todos que ajudaram a construir esta dissertação não é tarefa fácil. O maior perigo que se coloca para o agradecimento seletivo não é decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar. Então, aos meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

Como tenho que ser seletiva, então é melhor começar do início. Meu maior agradecimento é dirigido aos meus pais, por terem sido o contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores. Agradeço em especial a minha irmã (que mesmo sendo mais nova) que me ensinou e estimulou me levando em universidades, sempre me ensinando “atalhos” para que eu conseguísse o meu sonhado título de mestre. Agradeço, de forma muito carinhosa, a atuação de minha tia Roseli Rodrigues e ao meu tio Rogério Rodrigues no período de construção deste trabalho, sempre me dando força. Agradeço minha mãe, principalmente pela sua paciência infinita e sua crença absoluta na capacidade de realização a mim atribuída foram, indubitavelmente, os elementos propulsores desta dissertação e a meu pai por ter confiado em mim sempre que me deslocava para Dracena na estrada perigosa. Professor Fábio Erminio Mingatto, meu companheiro, soube compreender perfeitamente a minha trajetória na realização deste trabalho, sempre tentando entender minhas dificuldades e minhas ausências, procurando sempre manter contato por e-mails e telefonemas. Agradeço-lhe, carinhosamente, por tudo isso e por ter me inscrito em um congresso internacional onde pude conhecer outras culturas, e o meu agradecimento a você é o mais importante. Obrigada, muito obrigada, por ser um orientador dedicado e atencioso.

Minha esperança é que, compensando o tempo e esforço despendidos, algumas das idéias apresentadas aqui venham por ajudar a mim e a identificar maneiras adicionais de enriquecer suas vidas e contribuir com outras pesquisas.

Minha seleção, no âmbito acadêmico, deve também começar do início. Além do agradecimento acima, feito ao professor Fábio Mingatto, tenho que agradecê-lo por ter aceito a orientação de minha dissertação, na esperança de retribuir, com a seriedade de meu trabalho, a confiança em mim depositada.

Incluo, de forma especial, os nomes Marcos Maioli, Hyllana Catarina Dias de Medeiros e Marieli Guelfi e Ariane C. da Silva nesta minha lista seletiva. Foi sorte ter ele cruzado meu caminho acadêmico nesta etapa de conclusão de mestrado. Nunca me esquecerei de quando cuidaram dos animais para mim, da moradia oferecida e de todo ensino que me foi concedido. Marcos, jamais irei esquecer quando fomos cuidar dos animais no domingo enquanto você não tinha obrigação nenhuma, e pelas brigas que tínhamos, mas grande parte dessa vitória foi graças à você. Hyllana e Marieli agradeço pela paciência e pela ajuda nos experimentos. Sem vocês não conseguiria nada. E Ariane, sem sua agilidade nas lâminas, minha análise histopatológica não teria ficado tão boa.

Não posso esquecer também das amigas de faculdade que sempre me apoiaram e me ajudaram nesse sonho (Amanda Petek, Bruno Gonçalves Dias Moreno, Fabiana Barreiro, Helena de Castro, Paulo Koeke). E pelos amigos feitos no mestrado, Juliana Apolinário (jamais entraria sem você me ajudar), Jamila Baptistella, Carlos Eduardo Fabrício, Augusto Schweigert.

Agradeço principalmente meu coordenador Ulisses Bueno Marques, porque se não fosse por ele organizar meus horários, jamais conseguiria realizar todas as disciplinas do mestrado. Agradeço meus alunos pelos períodos de estresse quando meus experimentos não davam certo e sempre por terem paciência comigo.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1Objetivo.....	18
1.1.1 Objetivo geral.....	18
1.1.2 Objetivo específico.....	18
1.2 Hipótese.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Fígado e Hepatotoxicidade.....	19
2.2 Bixina.....	20
2.3 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo.....	22
2.4Lipoperoxidação.....	24
2.5 Tetracloreto de carbono.....	25
3. MATERIAL E MÉTODO.....	27
3.1 Avaliação ética.....	27
3.2 Animais.....	27
3.3Obtenção da Bixina.....	28
3.4Danos hepáticos induzidos pelo tetracloreto de carbono.....	28
3.5 Análise das enzimas indicadoras de funções hepáticas.....	28
3.6 Preparação do homogenato de fígado de rato.....	29
3.7 Determinação do nível de GSH.....	29
3.8 Determinação do nível de NADPH.....	29
3.9 Atividade da enzima glutathione redutase (GR).....	29
3.10 Avaliação da lipoperoxidação.....	30
3.11 Análise histopatológica.....	30
3.12 Análise estatística.....	31
4. RESULTADOS.....	31
4.1 Análise da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).....	31
4.2 Determinação do nível de GSH no homogenato.....	34
4.3 Determinação do nível de NADPH.....	35
4.4 Análise da atividade da Glutathione Redutase.....	36

4.5 Lipoperoxidação.....	37
4.6 Alterações histopatológicas.....	38
5 DISCUSSÃO.....	39
6 CONCLUSÃO.....	41
7 REFERÊNCIAS.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
ALT	Alanina transaminase
AST	Aspartato transaminase
BSA	Albumina de soro bovino
$\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_4$	Fórmula molecular da bixina
$\text{CCl}_3^\cdot$	Radical livre triclorometil
CCl_4	Tetracloroeto de carbono
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
Cit. P450	Citocromo P450
$\text{Cl}^\cdot$	Radical cloro
Cu^{++}	Íon cobre
CYP2E1	Isoforma do citocromo P-450 2E1
CYP3EA	Isoforma do citocromo P-450 3EA
CYP-450	Citocromo P-450
DMSO	Dimetilsulfóxido
e^-	Elétron
EGTA	Acido etilenoglicol bis-(β -aminoetil éter) N,N,N',N' tetracético
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FADH_2	Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
FCCP	Carbonilcianeto-p-trifluormetoxifenilhidrazona
Fe^{++}	Íon ferro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
H^+	Íon hidrogênio
H_2O_2	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
LO[•]	Radical alcóxila
nM	Nanomolar
LOOL	Lípido oxidado
mM	Milimolar
MDA	Malonaldeído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
O	Oxigênio
OPT	o-ftalaldeído
O₂	Oxigênio molecular
s	Segundos
O₂^{•-}	Radical superóxido
OH[•]	Radical hidroxila
pH	Potencial hidrogeniônico
SOD	Superóxido dismutase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estruturas da Z-bixina e E-Bixina.....	20
Figura 2.	Formação das espécies reativas de oxigênio.....	22
Figura 3.	Reação de Fenton.....	23
Figura 4.	Etapas da Lipoperoxidação.....	25
Figura 5.	Efeito do CCl ₄ sobre as células hepáticas.....	27
Figura 6.	Análise da ALT.....	32
Figura 7.	Análise da AST.....	33
Figura 8.	Determinação do nível de GSH.....	34
Figura 9.	Determinação do nível de NADPH.....	35
Figura 10.	Análise da atividade da Glutathione Redutase.....	36
Figura 11.	Lipoperoxidação.....	37
Figura 12.	Alterações histopatológicas.....	38

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA BIXINA SOBRE OS DANOS CAUSADOS PELO TETRACLORETO DE CARBONO NO FÍGADO DE RATOS

RESUMO - O fígado possui grande importância no organismo animal, pois realiza a biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos) e por esse motivo, o tecido hepático acaba sendo alvo potencial de substâncias tóxicas. A bixina, proveniente das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) é um antioxidante que pode contribuir para a proteção das células e tecidos contra os efeitos deletérios dos radicais livres e também possui efeitos farmacológicos como antiinflamatório, antibacteriano e antitumoral. No presente trabalho foi avaliado o efeito protetor da bixina sobre os danos hepáticos provocados pelo tetracloreto de carbono (CCl_4) em ratos. Os animais foram divididos em quatro grupos de seis animais cada. A dose de CCl_4 (0,125 mL/kg de peso corporal) foi injetada por via intraperitoneal (i.p.) e a bixina (5,0 mg/kg de peso corporal) foi administrada por gavagem por 7 dias antes da injeção do CCl_4 . Após a eutanásia, o sangue de cada animal foi colhido e foram analisadas a atividade sérica das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). O fígado foi removido e após a preparação do homogenato foi analisada a atividade da enzima glutationa redutase (GR), os níveis de glutationa reduzida (GSH) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH), além da peroxidação dos lipídios de membrana e alterações histopatológicas. A bixina protegeu os danos hepáticos provocados pelo CCl_4 conforme observado pela diminuição da liberação das enzimas ALT e AST. A bixina também protegeu o fígado contra os efeitos oxidantes do CCl_4 , uma vez que impediu a diminuição da atividade da enzima GR e dos níveis de GSH e NADPH. A peroxidação dos lipídios de membrana também foi inibida pela bixina. Além disso, o dano histopatológico do fígado foi significativamente reduzido pelo tratamento com a bixina. Portanto, pode-se concluir que o efeito protetor da bixina contra a hepatotoxicidade causada pelo CCl_4 está relacionado com a atividade antioxidante da substância.

Palavras-chave: Agentes oxidantes, hepatotoxicologia, radicais livres (Química), antioxidantes, urucum

PROTECTIVE EFFECT OF BIXIN AGAINST THE HEPATOTOXICITY INDUCED BY CARBON TETRACHLORIDE IN RATS

ABSTRACT - The liver has a great importance in the animal body since it is responsible to the biotransformation of exogenous chemicals (xenobiotics), making the liver tissue a potential target for toxic substances. The carotenoid bixin from annatto seeds (*Bixa orellana* L.) is an antioxidant that can contribute to protecting cells and tissues against the deleterious effects of free radicals and also has pharmacological effects such as anti-inflammatory, antibacterial and antitumoral activities. In the present study we evaluated the protective effect of the bixin on liver damage caused by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats. The animals were divided in four groups of six rats in each. The dose of CCl₄ (0.125 mL kg⁻¹ body wt.) was injected i.p. and bixin (5.0 mg kg⁻¹ body wt.) was given by gavage 7 days before the CCl₄ injection. After euthanasia, the blood of each animal was collected and the serum activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were analyzed. The livers were removed and after preparation of the homogenate the activity of the enzyme glutathione reductase (GR), the levels of reduced glutathione (GSH) and NADPH, as well as the peroxidation of membrane lipids and histopathological changes were determined. Bixin reduced the liver damage caused by CCl₄ as noted by the significant decrease of the release of the enzymes ALT and AST. Bixin also protected the liver against the oxidizing effects of CCl₄, since it prevented the decrease in GR activity and levels of GSH and NADPH. The peroxidation of membrane lipids was also inhibited by bixin. Moreover, the histopathological damage of liver was also significantly reduced by bixin treatment. Therefore, we can conclude that the protective effect of bixin against hepatotoxicity caused by CCl₄ is related to the antioxidant activity of the compound.

Keywords: Oxidative agents, hepatotoxicology, free radicals, antioxidants, annatto

1 INTRODUÇÃO

O fígado é 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).

A atividade do fígado no metabolismo de substâncias exógenas é mediada principalmente pelo citocromo P450 (CYP 450). Embora as reações de biotransformação estejam associadas ao processo de desintoxicação, em alguns casos o metabolismo do xenobiótico é prejudicial às células devido à produção de metabólitos altamente reativos, mais tóxicos do que o composto de origem, entre eles, eletrófilos, radicais e espécies reativas de oxigênio (ERO); estes, por sua vez, podem reagir diretamente com macromoléculas celulares ou iniciar reações em cadeia. Apesar deste processo de ativação ser o evento central em diversos fenômenos tóxicos, os hepatócitos possuem mecanismos de defesa efetivos para minimizá-los, de tal forma que é o balanço entre a bioativação, a desintoxicação e os mecanismos de defesa que determina se um composto irá ou não apresentar toxicidade (GÓMEZ-LECHÓN et al., 2001).

A espécie *Bixa orellana* L. pertence à família Bixaceae, sendo popularmente conhecida como urucum, açafrão, açafrão-da-terra, achiote, annatto(conforme a região). O seu produto é a semente, que apresenta cobertura rica em bixina, um corante do grupo dos carotenóides, de grande interesse nos mercados nacional e internacional. As folhas são utilizadas terapeuticamente para afecções do estômago e intestino, doenças coronarianas, respiratórias e urinárias e ainda, como afrodisíaco (COELHO et al., 2003).

O tetracloreto de carbono (CCl_4), um solvente usado na indústria, é uma molécula pequena e lipofílica que se distribui facilmente nos compartimentos lipídicos do corpo. É metabolizado no fígado onde para o mecanismo para a sua toxicidade ocorrer envolve a bioativação mediada pelo CYP 450 formando



o radical livre triclorometil ($\text{CCl}_3^\bullet$) ($\text{CCl}_4 + e^- \rightarrow \text{CCl}_3^\bullet + \text{Cl}^-$) o qual induz a peroxidação dos lipídios de membrana (BOELSTERLI, 2007).

Para proteger-se dos danos causados por agentes oxidantes a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause a lesão. Esta linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona peroxidase (GPx) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico (Vitamina C), pela glutathiona redutase (GR) e pela glutathiona peroxidase (GPx), entre outros (ROSS; MOLDEUS, 1991).

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, 1993; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). Este tipo de lesão oxidativa é definida como estresse oxidativo, que segundo Sies (1986), designa uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes.

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade (MELLO FILHO; HOFFMAN; MENEHINI, 1983).

Uma vez que a bixina é um dos mais eficazes supressores biológicos de oxigênio molecular e pode contribuir para a proteção das células e tecidos contra os efeitos deletérios dos radicais livres, sendo também um inibidor eficaz da peroxidação lipídica (Di MASCIO et al., 1990; SILVA; ANTUNES; BIANCHI, 2001), no presente estudo, avaliou-se a capacidade da bixina em reduzir os danos no fígado de ratos tratados com CCl_4 para avaliar o seu uso potencial no tratamento ou prevenção de doenças hepáticas.

1.1 Objetivo

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito protetor da bixina sobre os danos hepáticos provocados pelo tetracloreto de carbono em ratos.

1.1.2 Objetivo específico

Determinar o efeito da bixina sobre os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, visando contribuir para o conhecimento do mecanismo de proteção do composto contra a toxicidade em fígados de ratos.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: dosagem sérica das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); dosagem da atividade da enzima Glutathione Redutase (GR), além do nível de GSH e NADPH presente no homogenato de fígado de rato; efeito protetor da bixina contra a lipoperoxidação e análise histopatológica das estruturas hepáticas.

1.2 Hipótese

A bixina atua como protetor da função hepática frente à toxicidade induzida pelo tetracloreto de carbono.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fígado e hepatotoxicidade

Devido à sua interposição entre o trato digestivo e a circulação geral do organismo, o fígado desempenha uma função central no metabolismo. Ele recebe grandes quantidades de nutrientes e xenobióticos que são absorvidos por meio do trato digestivo e veia porta. 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 (GUILLOUZO, 1998).

Muitos xenobióticos são biotransformados e eliminados pelo fígado por meio do citocromo P450, principalmente na forma de conjugados sem que esse processo acarrete qualquer dano hepático. No entanto, alguns xenobióticos são concentrados a níveis tóxicos, enquanto outros são bioativados a reativos intermediários como eletrófilos, radicais e espécies reativas de oxigênio, os quais podem lesar o fígado de diversas maneiras, inclusive por indução do câncer (PARK et al., 2005; WALGREN; MITCHELL; THOMPSON, 2005; UETRECHT, 2007).

Apesar deste processo de ativação ser o evento central em diversos fenômenos tóxicos, os hepatócitos possuem mecanismos de defesa efetivos para minimizá-los, de tal forma que é o balanço entre a bioativação, a desintoxicação e os mecanismos de defesa que determina se um composto irá ou não apresentar toxicidade (GÓMEZ-LECHÓN et. al, 2001).

Os diversos aspectos da lesão química ao fígado incluem a natureza dos agentes hepatotóxicos, a característica da lesão, o mecanismo para os efeitos hepatotóxicos, as circunstâncias de exposição e a importância médica e social. Algumas hepatotoxinas encontradas na natureza são produtos de plantas, metabolismo de fungos e bactérias ou são minerais (SCHOENTAL, 1963). Muitos agentes hepatotóxicos são produtos da indústria química ou farmacêutica (TOLMAN; SIRRINE, 1998). Outros ainda são subprodutos ou resíduos de materiais industriais que, por poluir o ambiente, podem ter acesso a humanos e animais.

A lesão hepatotóxica pode ter várias formas. Alguns agentes levam à necrose, esteatose, cirrose ou carcinoma (SCHOENTAL, 1963; 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 curiosas lesões degenerativas ou vasculares.

2.2 Bixina

A espécie *Bixa orellana* L. pertence à família Bixaceae, sendo popularmente conhecida como urucum, açafroa, açafoeira-da-terra, achiote, annatto, conforme a região (COELHO et al., 2003). Tribos indígenas da floresta tropical têm usado o urucum para pintura do corpo e como medicamentos há séculos. Em uma suspensão de óleo é usado como um remédio popular para os Índios Ocidentais. (GOVINDARAJAN et al., 2003).

O principal produto é a semente, que apresenta cobertura rica em bixina, um corante do grupo dos carotenóides, de grande interesse nos mercados nacional e internacional. As folhas são utilizadas terapeuticamente para afecções do estômago e intestino, doenças coronarianas, respiratórias e urinárias e ainda, como afrodisíaco (COELHO et al., 2003).

A bixina possui uma cadeia isoprênica de 24 carbonos, contendo um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades, perfazendo assim a fórmula molecular $C_{25}H_{30}O_4$. Representa 80% dos pigmentos da *Bixa orellana* L., ocorrendo apenas nesta espécie e em *Aristolochia cymbifera* Mart. (FERNANDES, et al., 2002; ARAÚJO, 1999). A bixina ocorre naturalmente na forma 16-Z, porém durante o processo de extração é isomerizada conduzindo à forma 16-E, denominada isobixina (Figura 1) (SOUSA et al., 1991).

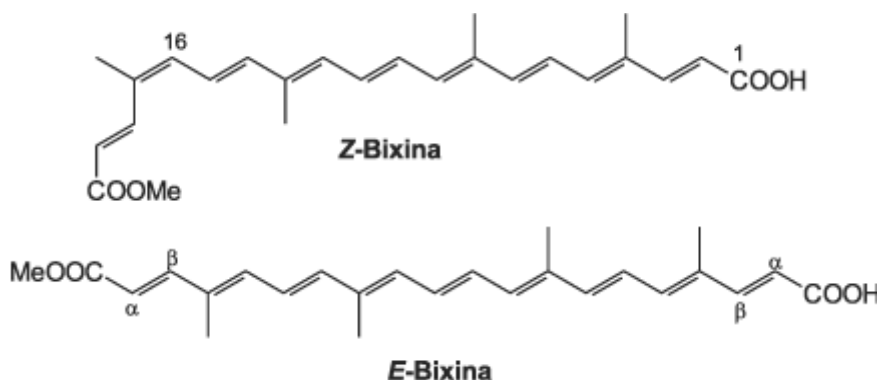


Figura 1. Estruturas da Z-bixina e E-bixina

Muitos estudos vêm sendo dirigidos para caracterização das propriedades antioxidantes de plantas, e identificação dos constituintes responsáveis por estas atividades (GOVINDARAJAN et al., 2003; MAHAKUNAKORN et al., 2004;).

O mecanismo exato de ação dos carotenóides como antioxidantes *in vivo* ainda não está determinado, porém acredita-se que esteja relacionado à sua capacidade de interagir eficientemente com íons radicais e com espécies reativas do oxigênio (CARDOSO, 1997).

Entre os carotenóides naturais, bixina é um dos mais eficazes supressores biológicos de oxigênio molecular e pode contribuir para a proteção das células e tecidos contra os efeitos deletérios dos radicais livres, sendo também um inibidor eficaz da peroxidação lipídica (Di MASCIO et al., 1990; SILVA; ANTUNES; BIANCHI, 2001).

Lima et al. (2001) desenvolveram pesquisas com bixina, norbixina e quercetina e avaliaram seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. A bixina apresentou o maior valor na redução do colesterol total. Com relação à concentração de triacilgliceróis, a quercetina obteve a maior percentagem de redução e a associação bixina + quercetina demonstrou uma percentagem de redução de 38,92%, valor maior que o da bixina isoladamente.

A literatura relata ainda que os carotenóides apresentam efeito antioxidante, sendo de importância na prevenção da aterosclerose. A lipoproteína LDL, quando oxidada, danifica o endotélio e, por conseguinte, a ação antioxidante dos carotenóides, entre os quais se incluem a bixina e a norbixina, protegeria o endotélio dos danos desta lipoproteína. As lesões ateroscleróticas iniciam-se após algum tipo de dano ao endotélio normalmente causada pela LDL oxidada. Os carotenóides são captados neste processo e impedem esta oxidação. Assim, considerando que estas substâncias possam ser viabilizadas, no futuro, como medicamentos no controle do metabolismo lipídico, testes toxicológicos tornam-se necessários (PERES, 2000).

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.

2.3 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

O elemento oxigênio (O) pode ser considerado um radical livre, já que apresenta desemparelhamento de elétrons na sua última camada eletrônica, conferindo a ele uma alta reatividade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). As espécies reativas ao oxigênio (ERO) incluem todos os radicais derivados do oxigênio e encontrados em todos os sistemas biológicos. Segundo Nordberg e Arnér (2001), em condições fisiológicas, o O_2 sofre uma redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando em formação de água. Durante esta reação são formados reativos intermediários como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila ($OH^{\bullet}$). Além destes, temos o não radical, peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Uma inibição na cadeia transportadora de elétrons desencadearia um aumento na meia-vida de intermediários com elétrons desemparelhados, capazes de reduzir oxigênio molecular a íons superóxidos. A redução parcial do oxigênio molecular, por adição de um elétron, gera íon superóxido que reage com outro elétron, originando o íon peróxido que se protona gerando peróxido de hidrogênio. Este, embora não seja um radical livre, é um potente oxidante podendo gerar um radical muito reativo, a hidroxila (Figura 2) (MARZZOCO; TORRES, 2007).

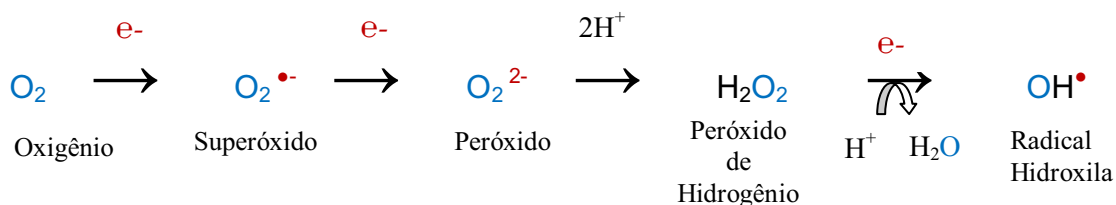


Figura 2. Formação das espécies reativas de oxigênio.

De acordo com Marzzoco e Torres (2007), a cadeia transportadora de elétrons é considerada a maior fonte endógena de espécies reativas de

oxigênio, além dos peroxissomos, retículo endoplasmático e células do sistema imunológico (onde a produção é fundamental para combater agentes agressores externos como as bactérias, por exemplo). Estas espécies reativas interagem com proteínas e DNA modificando suas estruturas e com lipídios, transformando-os em peróxidos, por reação com duplas ligações pertencentes às moléculas dos ácidos graxos componentes das membranas, podendo desencadear lise celular.

O radical hidroxila é considerado o mais reativo em sistemas biológicos e é formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^{++}), denominada de reação de Fenton e de Haber-Weiss, como representada na Figura 3:

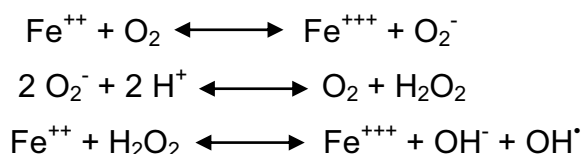


Figura 3. Reação de Fenton e de Haber-Weiss

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é extremamente danoso, pois tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas. Uma vez produzido, o H_2O_2 é removido por um dos três sistemas de enzimas antioxidantes como a catalase, a glutathiona peroxidase e peroxiredutases (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes oxidantes, como as ERO, e o sistema de defesa antioxidante. Como citado anteriormente, esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O_2 e também em situações não fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de O_2 . Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause a lesão. Esta linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico (Vitamina C), pela glutathiona-redutase (GSH-

Rd) e pela glutaiona peroxidase (GSH-Px), entre outros (ROSS; MOLDEUS, 1991).

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, 1993; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). Este tipo de lesão oxidativa é definida como estresse oxidativo, que segundo Sies (1986), designa uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes.

2.4 Lipoperoxidação

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROS, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (MELLO FILHO; HOFFMAN; MENEHINI, 1983). Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, (como o malonaldeído), culminando na morte celular (HERSHKO, 1989). A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos do envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (SHAN; AW; JONES, 1990). Assim como na formação das EROS, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (ROSS; MOLDEUS, 1991).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes (Figura 4), onde L representa o lipídio (GARDÈS-ALBERT; JORE; FERRADINI, 1991).

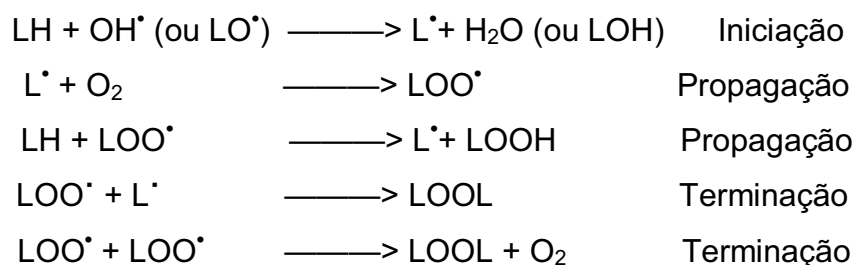


Figura 4. Etapas da Lipoperoxidação

A reação acima se inicia com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo $\text{OH}^\bullet$ ou pelo $\text{LO}^\bullet$ (radical alcóxila), com consequente formação do $\text{L}^\bullet$ (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o $\text{L}^\bullet$ reage rapidamente com o O_2 , resultando em $\text{LOO}^\bullet$ (radical peróxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o $\text{L}^\bullet$ na segunda reação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ($\text{L}^\bullet$ e $\text{LOO}^\bullet$) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem a si próprios.

2.5 Tetracloreto de Carbono

O tetracloreto de carbono (CCl_4) é uma molécula pequena e lipofílica e, portanto, distribui-se facilmente nos compartimentos lipídicos do corpo. É metabolizado no fígado, e o mecanismo para a sua toxicidade envolve a bioativação do CCl_4 mediada pelo CYP e indução de peroxidação dos lipídios de membrana (BOELSTERLI, 2007).

O tetracloreto de carbono é um xenobiótico que apresenta efeitos devastadores sobre o fígado, tais como: aparência inchada e macia, elevação dos níveis séricos de bilirrubina e enzimas hepáticas como aspartato-aminotransferase (AST), e diminuição dos níveis séricos de proteínas como albumina e fibrinogênio. Além desses efeitos, doses agudas podem causar necrose e esteatose hepática, cirrose e fibrose no tecido formador do órgão.

O metabolismo do tetracloreto de carbono nos animais de acordo com Recknagel et al. (1989) realizado pela desalogenação redutiva dependente do

citocromo P450, acontecendo assim a bioativação. A enzima CYP2E1 é a principal responsável pela metabolização do CCl_4 , mas existem outras enzimas que realizam essa função, porém em menor proporção, como a CYP3EA. Muitos estudos indicam que a primeira etapa de sua bioativação envolve clivagem homolítica de uma ligação cloro-carbono no CCl_4 para gerar o íon cloreto (Cl^-) e o radical triclorometil ($\text{CCl}_3^\bullet$). Anaerobicamente, o radical do triclorometil pode submeter-se a diversas reações, como a ligação direta aos lipídeos e às proteínas microssomais; adição de um próton e um elétron para formar clorofórmio; dimerização para formar hexacloroetano; e descloração redutiva para formar monóxido de carbono. Aerobicamente o radical triclorometil pode ser oxigenado pelo sistema oxidase de função mista para formar o triclorometanol, um precursor do foscênio, e esse quando sofre clivagem hidrolítica representa, provavelmente, a principal via metabólica pela qual o dióxido de carbono é formado a partir de tetracloreto de carbono.

Acredita-se que a clivagem homolítica mediada pelo citocromo P450, da ligação do carbono-cloro no tetracloreto de carbono, seja seguida pela abstração do hidrogênio de um grupo metileno de um ácido graxo poliênico nos lipídeos microssomais, pelo radical triclorometil, formando-se assim, radicais livres orgânicos. Estes radicais livres orgânicos (peróxi) são altamente instáveis e clivam-se homoliticamente para formar novos radicais livres, que atacam os grupos metileno dos lipídeos poliênicos presentes na membrana. Este processo ocorre muito rapidamente e associados à presença de radicais livres podem causar a degradação de organelas existentes nas células, o que leva a perda de sua função e até mesmo a morte celular.

O efeito tóxico do tetracloreto de carbono portanto é decorrente de sua conversão pelo citocromo P450, no radical livre triclorometil ($\text{CCl}_3^\bullet$) ($\text{CCl}_4 + e^- \longrightarrow \text{CCl}_3^\bullet + \text{Cl}^-$). Os radicais livres produzidos causam auto-oxidação dos ácidos graxos poliênicos presentes nos fosfolípidios da membrana do retículo endoplasmático e nos peróxidos orgânicos. Essa reação é auto catalítica, pois novos radicais são formados a partir dos próprios radicais do peróxido. Por conseguinte, não é de surpreender que a lesão celular hepática induzida por CCl_4 seja intensa, como demonstrado na (Figura 5) e de início, extremamente rápida (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

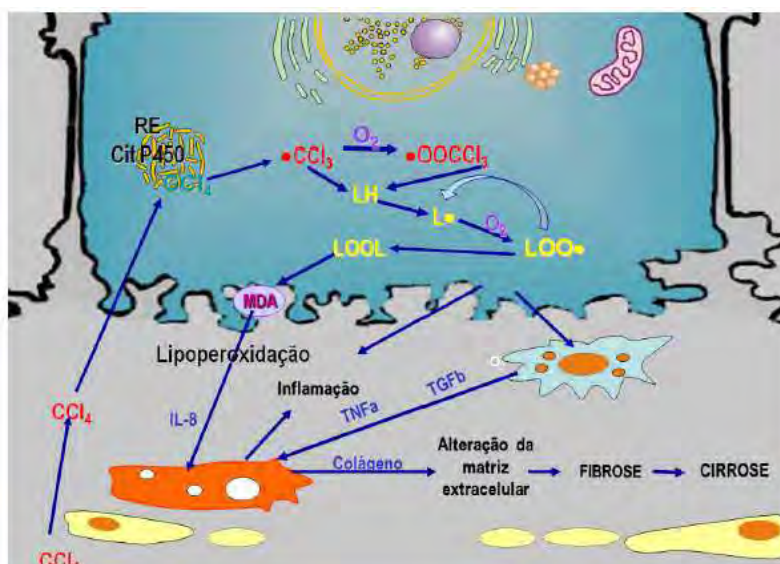


Figura 5. Efeito do tetracloreto de carbono sobre as células hepáticas. Fonte: Domínio Público

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação ética

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) 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. 20/2010).

3.2 Animais

Ratos Wistar machos, provenientes do Biotério Central da Unesp (Campus de Botucatu), ficaram alojados no Biotério do Campus Experimental de Dracena, em número de seis animais por caixa, com cobertura metálica e serragem de madeira. As caixas plásticas, com dimensões (CxLxA) 41x34x16 cm, foram armazenadas sob temperatura controlada de aproximadamente 22°C e os animais receberam alimento e água *ad libitum*, sendo divididos em quatro grupos:

Grupo 1 (controle): recebeu óleo de canola por gavagem gástrica durante 7 dias e óleo mineral (0,5 mL/kg de peso vivo, por via intraperitoneal) no último dia de tratamento.

Grupo 2: recebeu a bixina dissolvida em óleo de canola por gavagem gástrica (5 mg/kg de peso vivo) durante 7 dias e óleo mineral no último dia de tratamento.

Grupo 3, recebeu óleo de canola por gavagem gástrica durante um período de 7 dias e uma dose única de CCl_4 diluído em óleo mineral (0,125 mL/kg de peso vivo, por via intraperitoneal) no último dia de tratamento.

Grupo 4, recebeu bixina por gavagem gástrica (5 mg/kg de peso vivo) durante 7 dias e uma dose única de CCl_4 diluído em óleo mineral (0,125 mL/kg de peso vivo, por via intraperitoneal) no último dia de tratamento.

3.3 Obtenção da bixina

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

3.4 Danos hepáticos induzidos pelo tetracloreto de carbono

Após 24 horas da administração do veículo ou do CCl_4 os animais foram eutanasiados por decapitação sob anestesia com éter onde foram avaliados os seguintes parâmetros: dosagem sérica das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); dosagem da atividade da enzima Glutathione Redutase (GR), além do nível de GSH e NADPH presente no homogenato de fígado de rato; efeito protetor da bixina contra a lipoperoxidação e análise histopatológica das estruturas hepáticas.

3.5 Análise das enzimas indicadoras de funções hepáticas

Após a decapitação, o sangue dos animais dos grupos foi coletado individualmente em tubos tipo “Falcon” de 15 mL, e mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos para coagulação. O soro foi separado por centrifugação, com velocidade de 3000 g por 15 minutos. A atividade das enzimas indicadoras de funções hepáticas (ALT e AST) foi dosada por meio de

kits comerciais de dosagem enzimática (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 Preparação do homogenato de fígado de rato

Os ratos dos grupos tratados e controle foram eutanasiados por decapitação sob anestesia com éter e 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, onde foi picado 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.

3.7 Determinação do nível de GSH

A determinação do nível de GSH no homogenato do fígado dos animais tratados e controle foi realizada de acordo com Hissin e Hilf (1976) utilizando-se tubos do tipo “eppendorf” de 2 mL. Colocado o homogenato (1 mg de proteína), 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 homegeneização 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 µL de tampão contendo NaH₂PO₄ 0,1 M, pH 8,0, com EDTA 5 mM, 100 µL do sobrenadante obtido da centrifugação e 100 µL de OPT (o-ftalaldeído) 1mg/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 5 em ambos os casos. Os dados foram representados em unidades relativas de fluorescência.

3.8 Determinação do nível de NADPH

O homogenato (1mg de proteína/mL) foi adicionado ao meio padrão (volume final de 1,5 mL) contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, EGTA 0,5 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2, e centrifugado a 8000 g por 3 min. Em seguida o sobrenadante foi coletado e a fluorescência determinada em espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tokyo, Japão) com comprimento de onda de 366 e 450 para excitação e emissão respectivamente (LUND; MILLER; WOODS, 1993). Os dados foram representados em unidades relativas de fluorescência.

3.9 Atividade da enzima glutathione redutase (GR)

Em cubetas 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 µL de triton X-100 a 10%, homogenato do fígado dos animais tratados ou controle (1mg de proteína) e 10 µL de GSSG 100 mM. Em seguida as amostras foram incubadas a 30°C por 5 minutos. Logo após foram adicionados 10 µL de NADPH 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).

3.10 Avaliação da lipoperoxidação

A proteção contra lipoperoxidação foi determinada utilizando o método do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). O homogenato do fígado (5 mg de proteína/mL), foi colocado 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 ácido tiobarbitúrico (TBA) (solução aquosa a 0,67%), e o volume foi completado até 4 mL com água deionizada (milli-Q) e a mistura 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 malondialdeído (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 medida a 535 nm (BUEGE; AUST, 1977). A concentração de lipoperóxidos foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

3.11 Análise histopatológica

Um fragmento do fígado dos animais tratados e do grupo controle foi colhido e fixado em formol 10% tamponado, pH 7,4 por 24 horas. Após esse período, foram realizadas lavagens para a remoção do fixador e o tecido foi submetido ao processo de desidratação em álcool e xilol e embebidos em cera de parafina. Cortes de 5 µm foram montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina, para avaliação das alterações histopatológicas (HUMASON, 1972).

3.12 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 por meio do programa GraphPad Prism, versão 4.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA 03/04/2003).

4 RESULTADOS

4.1 Análise da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)

Conforme observado nas Figuras 6 e 7 o tratamento com CCl_4 promoveu um aumento significativo da atividade sérica da ALT e da AST, as quais foram utilizadas como parâmetro da intensidade de lesão hepática. A comparação entre os grupos 3 e 4 mostra que o tratamento prévio com a bixina protegeu o fígado dos danos provocados pelo CCl_4 .

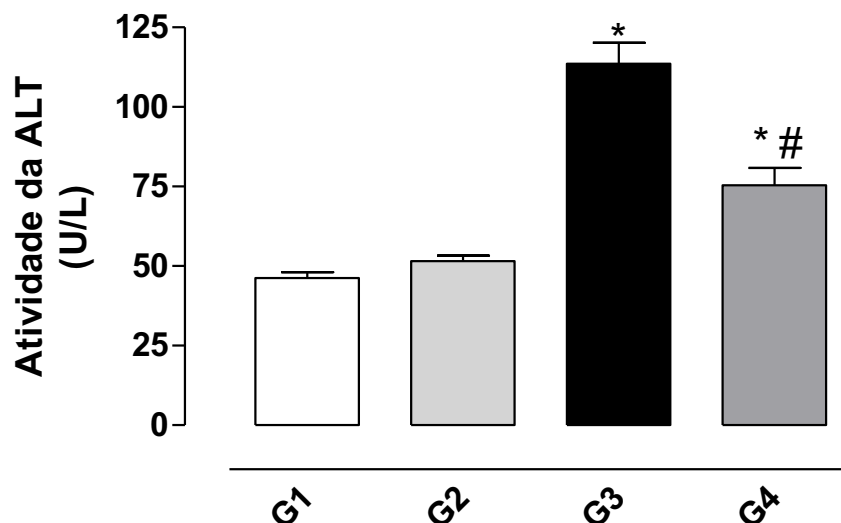


Figura 6. Efeito protetor da bixina sobre a hepatotoxicidade induzida pelo CCl_4 avaliada pela liberação da enzima alanina aminotransferase (ALT) no soro de ratos conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = controle bixina; G3 = CCl_4 ; G4 = bixina + CCl_4 . *Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,05$). #Significativamente diferente do grupo tratado com CCl_4 (G3) ($P < 0,05$).

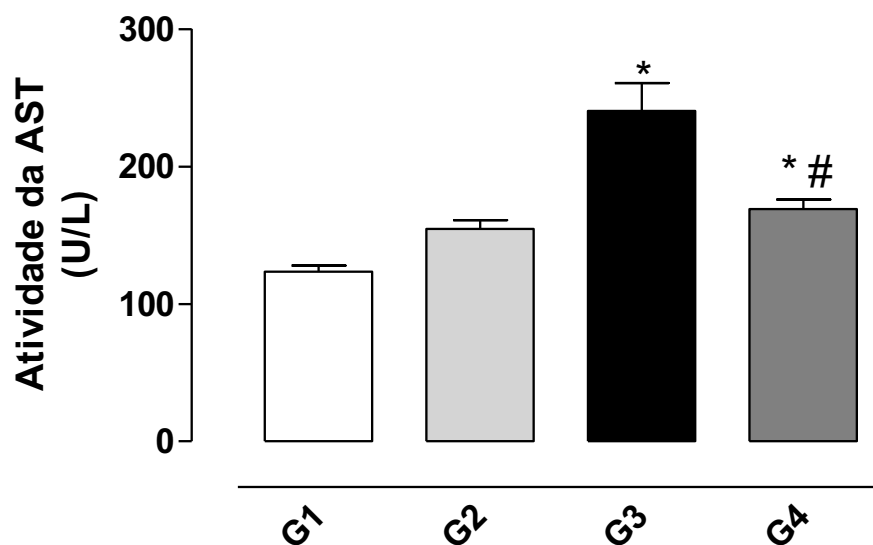


Figura 7. Efeito protetor da bixina sobre a hepatotoxicidade induzida pelo CCl_4 avaliada pela liberação da enzima aspartato aminotransferase (AST) no soro de ratos conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = controle bixina; G3 = CCl_4 ; G4 = bixina + CCl_4 . *Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,05$). #Significativamente diferente do tratado com CCl_4 (G3) ($P < 0,05$).

4.2 Determinação do nível de GSH no homogenato

Ocorreu uma redução do nível de GSH do homogenato de fígado dos animais tratados com CCl_4 (G3) indicando que o tetracloreto de carbono induziu a oxidação da glutathiona presente no homogeneato (Figura 8). O tratamento prévio dos animais com a bixina (G4) protegeu o fígado do efeito provocado pelo CCl_4 .

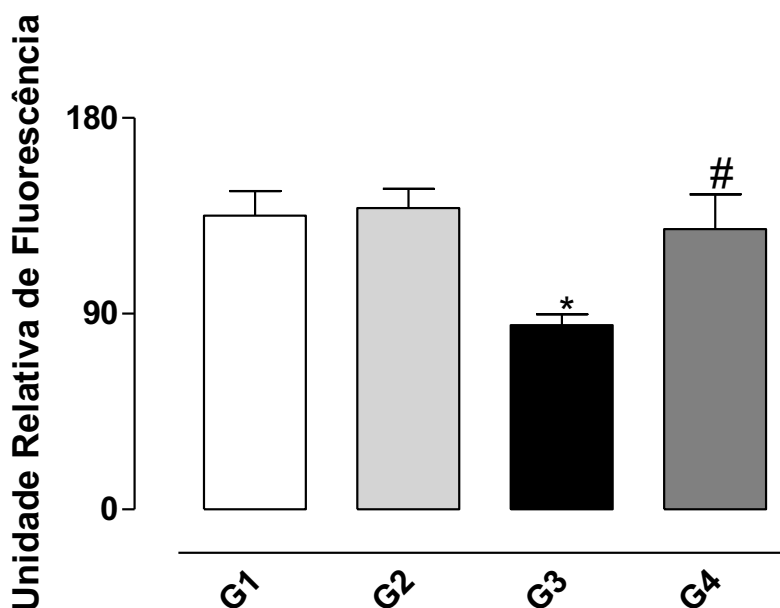


Figura 8. Efeito protetor da bixina sobre a oxidação de GSH induzida pelo CCl_4 no homogenato de fígado de ratos conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = controle bixina; G3 = CCl_4 ; G4 = bixina + CCl_4 . *Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,05$). #Significativamente diferente do tratado com CCl_4 (G3) ($P < 0,05$).

4.3 Determinação do nível de NADPH

Ocorreu uma redução do nível de NADPH no grupo tratado com CCl_4 (G3) em relação ao controle, demonstrando que o CCl_4 promoveu a oxidação do composto. O tratamento prévio dos animais com a bixina (G4) protegeu o fígado do efeito provocado pelo CCl_4 (Figura 9).

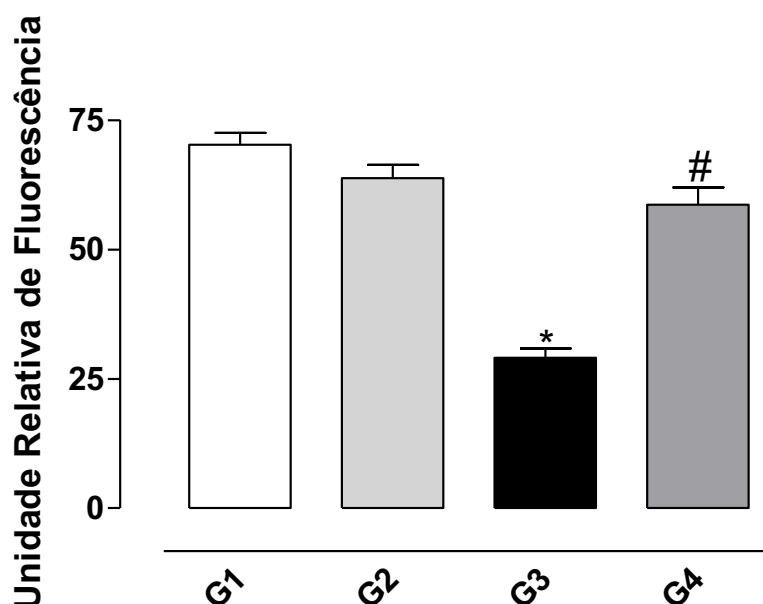


Figura 9: Efeito protetor da bixina sobre a oxidação de NADPH induzida pelo CCl_4 no homogenato de fígado de ratos conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = controle bixina; G3 = CCl_4 ; G4 = bixina + CCl_4 . *Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,05$). #Significativamente diferente do tratado com CCl_4 (G3) ($P < 0,05$).

4.4 Análise da atividade da Glutathione Redutase

A análise da atividade da enzima Glutathione Redutase demonstra que houve uma redução significativa no grupo tratado com o CCl_4 (G3) em relação ao controle. O tratamento prévio dos animais com a bixina (G4) protegeu contra o efeito provocado pelo CCl_4 sobre a enzima (Figura 10).

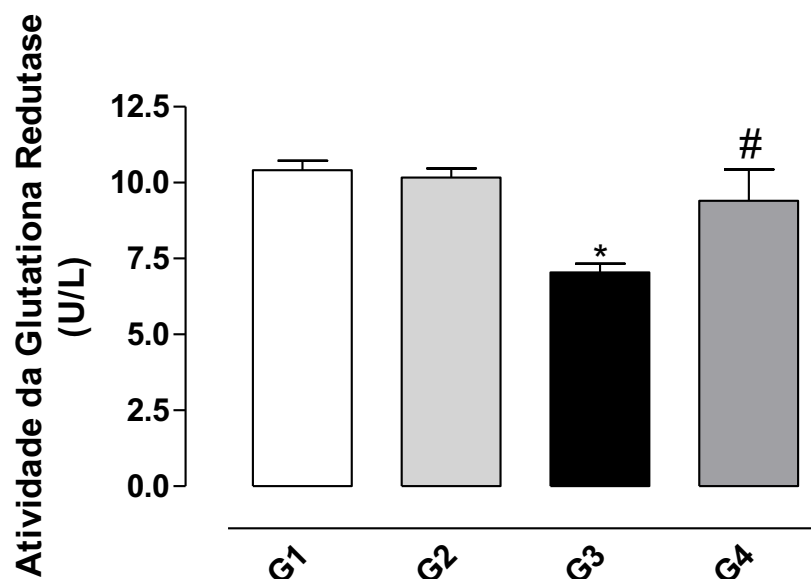


Figura 10: Efeito protetor da bixina sobre a diminuição da atividade da enzima Glutathione Redutase induzida pelo CCl_4 no homogenato de fígado de ratos conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = controle bixina; G3 = CCl_4 ; G4 = bixina + CCl_4 . *Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,05$). #Significativamente diferente do tratado com CCl_4 (G3) ($P < 0,05$).

4.5 Lipoperoxidação

Em relação à concentração de malonaldeído (MDA), os resultados demonstram que o tratamento com CCl_4 (G3) estimulou significativamente o aumento na produção desse composto em relação ao grupo controle, indicando uma peroxidação dos lipídeos de membrana. O tratamento prévio com a bixina protegeu o fígado da oxidação dos lipídeos provocada pelo CCl_4 (Figura 11).

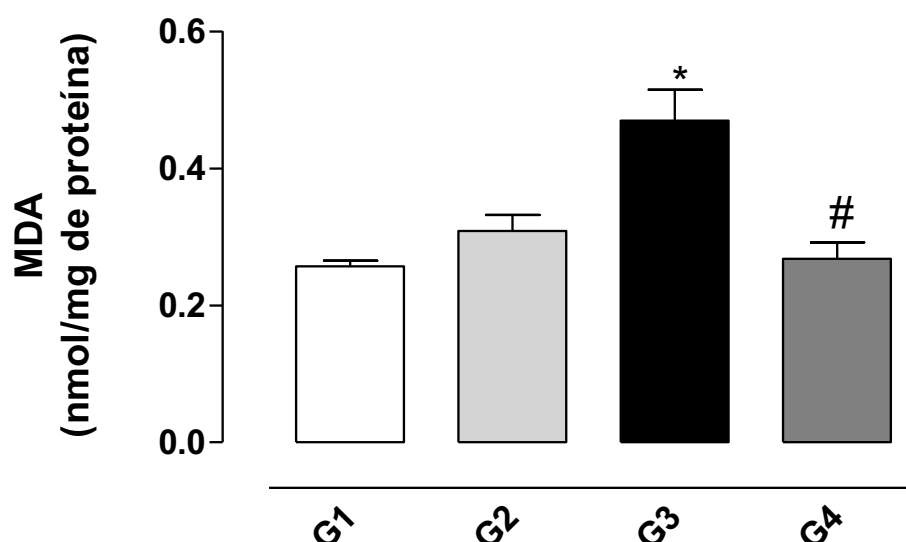


Figura 11: Efeito protetor da bixina sobre o aumento no nível de malonaldeído (MDA) induzido pelo CCl_4 no homogenato de fígado de ratos conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = controle bixina; G3 = CCl_4 ; G4 = bixina + CCl_4 . *Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,05$). #Significativamente diferente do tratado com CCl_4 (G3) ($P < 0,05$).

4.7 Alterações histopatológicas

Não houve alteração histológica aparente no fígado dos ratos controle tratados com óleo (G1) ou bixina (G2) (Fig. 12A e 12B, respectivamente). A administração do CCl_4 (G3) provocou danos no fígado dos ratos, conforme demonstrado por necrose dos hepatócitos e degeneração hidrópica (Fig. 12C) enquanto que o tratamento prévio com a bixina protegeu parcialmente o fígado das lesões induzidas pelo composto (Fig. 12D).

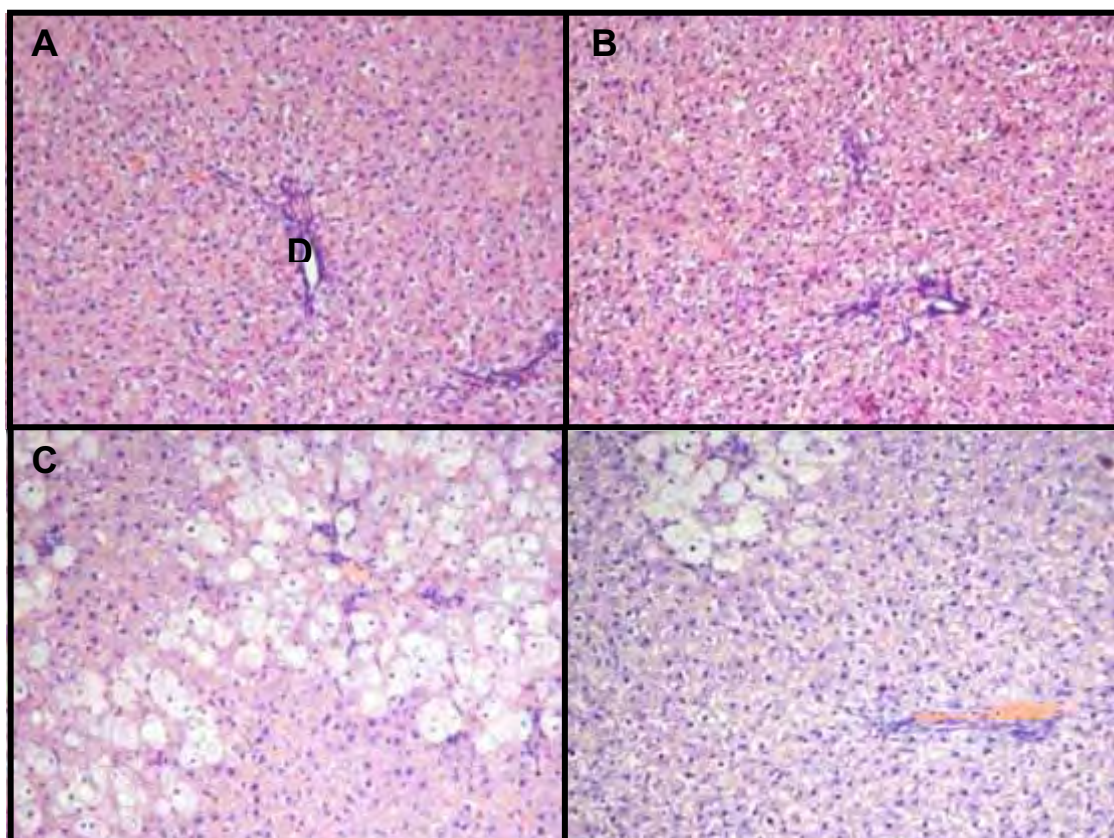


Figura 12. Efeito da bixina na caracterização histopatológica de fígado de ratos tratados com CCl_4 (200x). A, G1 = controle; B, G2 = controle bixina; C, G3 = CCl_4 ; D, G4 = bixina + CCl_4 .

5. DISCUSSÃO

O fígado tem uma importante função no metabolismo e na biotransformação de substâncias exógenas. Devido à sua interposição entre o trato digestivo e o sistema circulatório, ele recebe grandes quantidades de nutrientes e xenobióticos que são absorvidos por meio do trato digestivo e veia porta, tornando-se órgão alvo de várias classes de toxicantes e toxinas naturais ou sintéticas (GUILLOUZO, 1998).

O CCl_4 é uma toxina que causa lesão no fígado e tem sido utilizado como agente tóxico em vários estudos para indução de danos hepáticos (PAVANATO et al, 2003; LEE et al, 2007; SHANKAR et al, 2008; SRIVASTAVA; SHIVANANDAPPA, 2010; ĆEBOVIĆ; MAKSIMOVIĆ, 2012). As características patológicas mais marcantes na hepatotoxicidade induzida pelo CCl_4 são esteatose hepática, cirrose e necrose, que resultam da formação de intermediários reativos, tais como radicais triclorometil ($\text{CCl}_3^\cdot$), gerados pela sua biotransformação mediada CYP450 induzindo assim a peroxidação dos lipídios de membrana (RECKNAGEL et al., 1989; JIMENEZ et al., 1992; BOELSTERLI, 2007).

A bixina é um carotenóide com dois grupos de ácido carboxílico em sua estrutura e é o pigmento mais importante encontrado no urucum, correspondendo a cerca de 80% dos carotenóides presentes na semente da planta (PRESTON; RICKARD, 1980; SCOTTER, 2009). Este composto tem sido apresentado como um agente protetor de células e tecidos contra os efeitos deletérios de espécies reativas de oxigênio e radicais livres e ainda, tem efeito de redução do colesterol (Di MASCIO et al., 1990; ZHANG, et al., 1991; LIMA et al., 2001; BARCELOS, 2012; SANTOS et al., 2012). Em um estudo realizado por SILVA et al., 2001, os autores avaliaram o papel da bixina contra o estresse oxidativo induzido pela cisplatina em rins de ratos Wistar, nas doses de 2,5 e 5,0 mg/kg de peso corporal, por meio de gavagem. O pré-tratamento com a dose mais elevada de bixina resultou na redução do número total de aberrações cromossômicas e da peroxidação lipídica, além de inibir a depleção de glutatona reduzida induzida pela cisplatina, justificando-se assim o uso da bixina 5,0 mg/kg de peso corporal em nosso estudo.

As atividades séricas da alanina aminotransaminase (ALT) e da aspartatotransaminase (AST), são utilizadas como uma indicação da extensão

de dano no fígado devido à liberação de grandes quantidades dessas enzimas para a corrente sanguínea (KAPLOWITZ, 2001). A AST é distribuída nos tecidos do corpo, incluindo os músculos e coração, e no fígado está principalmente presente na mitocôndria dos hepatócitos, enquanto a ALT é encontrada principalmente no fígado, no citosol. O CCl_4 induz a peroxidação lipídica danificando assim as membranas das células e organelas do fígado, resultando em liberação de ALT e AST no sangue circulante (SHANKAR et al., 2008). Assim, nossos resultados mostraram que o tratamento com CCl_4 promoveu um aumento significativo das atividades séricas da ALT e AST conforme observado nas Figuras 6 e 7. O pré-tratamento com bixina protegeu o fígado dos danos causados pelo CCl_4 , uma vez houve redução na liberação das enzimas.

Como mencionado acima, os efeitos hepatotóxicos do metabolismo de CCl_4 são principalmente devido ao seu metabolito ativo, o radical triclorometil. O radical ativado liga-se covalentemente a macromoléculas e induz a peroxidação dos lipídios de membrana que são ricos em ácidos graxos poliinsaturados. Isto leva à formação de peróxidos de lipídios que por sua vez formam produtos, tais como o malonaldeído (MDA), que causam danos às membranas (ESTERBAUER et al., 1991; GUÉRAUD et al., 2010). O conteúdo de MDA do fígado aumentou em ratos tratados com CCl_4 sugerindo que o mecanismo de defesa natural antioxidante para eliminar excesso de radicais livres foi comprometido. Porém, o tratamento prévio com a bixina restaurou o nível do MDA a valores próximos aos do grupo controle (Figura 11). Nossos resultados estão de acordo com o encontrado por Silva; Antunes; Bianchi (2001).

Para se proteger contra danos causados pela oxidação a célula possui um sistema de defesa que inclui a glutathiona reduzida (GSH), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH), enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). O desequilíbrio entre a formação e remoção de radicais livres no corpo, devido à redução de antioxidantes endógenos ou aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante conhecido como estresse oxidativo, o que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e em estruturas celulares, possivelmente,

resultando em morte celular (ROSS; MOLDEUS, 1991). Sob condições de estresse oxidativo, pode ocorrer a redução de alguns dos fatores endógenos de proteção. Por conseguinte, o tratamento de animais com CCl_4 causou uma diminuição significativa nos níveis de GSH, conforme observado na Figura 8, e NADPH, como demonstrado na Figura 9, e ainda, na atividade da GR (Figura 10). No entanto, observou-se um efeito protetor da bixina contra o estresse oxidativo causado por CCl_4 , uma vez que o pré-tratamento dos animais com o carotenóide impediu a oxidação de GSH e NADPH e promoveu um aumento da atividade da GR, indicando uma propriedade antioxidante do composto.

As observações histológicas de amostras de fígado suportam fortemente o efeito hepatoprotetor da bixina (Figura 12). O tetracloreto causou várias alterações histológicas no fígado, incluindo a necrose celular, inflamação e degeneração hidrópica das células hepáticas. Estas alterações foram atenuadas pela bixina, observando-se diminuição da necrose hepatocelular e menor infiltração de células inflamatórias.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que a bixina protegeu o fígado de rato dos efeitos oxidativos provocados pelo CCl_4 , uma vez que ela diminuiu a lipoperoxidação, juntamente com a elevação nos níveis de GSH e NADPH e da atividade da enzima Glutathione redutase. Além disso, a bixina protegeu o fígado dos danos hepáticos causados pelo CCl_4 , conforme demonstrado pela redução da atividade sérica da ALT e AST e pela melhoria das alterações histopatológicas. Esta proteção pode estar principalmente relacionada com a atividade antioxidante da bixina e seu uso terapêutico poderia ser considerado em situações clínicas.

7. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2. ed. Viçosa: Editora da UFV, 1999.

BARCELOS, G.R. 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, p.535-541, 2012.

BOELSTERLI, U.A. Xenobiotic-induced oxidative stress: cell injury, signaling and gene regulation. In: BOELSTERLI, U.A. (Ed). **Mechanistic toxicology**: the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. Boca Raton: CRC Press, 2007. p.117-175.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v.52, p.302-310, 1978.

CAIN, K.; SKILLETER, D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (Ed). **Biochemical toxicology**. Oxford: IRL Press, 1987. p.217-254.

CARDOSO, S.L. Fotofísica de carotenóides e o papel antioxidante do β -caroteno. **Quím. Nova**, v.20, p.535-540, 1997.

ĆEBOVIĆ, T.; MAKSIMOVIĆ, Z. Hepatoprotective effect of *Filipendula hexapetala* Gilib. (Rosaceae) in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **Phytother. Res.**, v.26, p.1088-1091, 2012.

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

COTRAN, R.S; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins, patologia estrutural e funcional**. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.61-71.

Di MASCIO, P. et al. Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. **Biochem. Soc. Trans.**, v.18, p.1054-1056, 1990.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Rad. Biol. Med.**, v.11, p.81-128, 1991.

FERNANDES, A.C.S. et al. 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. **J. Nutr. Biochem.**, v.13, p.411-420, 2002.

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.

GÓMEZ-LECHÓN, M.J. et al. The use of cultured hepatocytes to investigate the metabolism of drugs and mechanisms of drug hepatotoxicity. **ATLA**, v.29, p.225-231, 2001.

GOVINDARAJAN, R. et al. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. **Biol. Pharm. Bull.**, v.26, n.10, p.1424-1427, 2003.

GUÉRAUD, F. et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. **Free Rad. Res.**, v.44, p.1098-1124, 2010.

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

GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence. **Free Rad. Res. Commum.**, v.19, p.141-1583, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. Oxford: Claredon Press, 2000.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin. Hematol.**, v.26, p.277-285, 1989.

HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal. Biochem.**, v.74, p. 214-226, 1976.

HUMASON, G.L. **Animal tissue techniques**. San Francisco: W.H. Freeman, 1972. p.641.

JIMENEZ, W. et al. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: an useful tool for investigating the patogenesis in chronic liver disease. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.7, p.90-97, 1992.

KAPLOWITZ, N. Drug-Induced Liver Disorders Implications for Drug Development and Regulation. **Drug Saf.**, v.24, p.483-490, 2001.

LEE, K.J.; CHOI, J.H.; JEONG, H.G. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. **Food Chem. Toxicol.**, v.45, p.2118-2125, 2007.

LIMA, L.R.P. et al. Bixin, norbixin and quercetin and lipid metabolism effects in rabbits. **Braz. J. Vet. Res. An. Sci.**, v.38, p.196-200, 2001.

LUND, B.O.; MILLER, D.M.; WOODS, J.S. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. **Biochem. Pharmacol.**, v.45, p.2017-1024, 1993.

MAHAKUNAKORN, P. et al. Antioxidant and free radical-scavenging activity of Choto-san and its related constituents. **Biol. Pharm. Bull.**, v.27, p.38-46, 2004.

MARZZOCO A.; TORRES B.B. Bioquímica Básica. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MELLO FILHO, A.C.; HOFFMAN, M.E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochem. J.**, v.218, p.273-275, 1983.

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

PARK, B.K. et al. The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.45, p.177-202, 2005.

PAVANATO, A. et al. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **Dig. Dis. Sci.**, v.48, p.824-829, 2003.

PERES, W. et al. The flavanoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. **J. Hepatol.**, v.33, p.742-750, 2000.

PRESTON, H.D.; RICKARD, M.D. Extraction and chemistry of annatto. **Food Chem.**, v.5, p.47-56, 1980.

RECKNAGEL, R.O. et al. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. **Pharmacol. Therapeut.**, v.43, p.139-154, 1989.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: Vigo-Pelfrey, C. (Ed). **Membrane lipid oxidation**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.151-70.

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

SANTOS, G.C. et al. Protective effect of bixin on cisplatin-induced genotoxicity in PC12 cells. **Food Chem. Toxicol.**, v.50, p.335-340, 2012.

SCHOENTAL, R. Liver disease and "natural" hepatotoxins. **Bull. World Health Organ.**, v.29, p.823-833, 1963.

SCOTTER, M. The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review, **Food Add. Contam.: Part A**, v.26, p.1123-1145, 2009.

SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol. Ther.**, v.47, p.61-71, 1990.

SHANKAR, N.L.G. et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Commiphora berryi* (Arn) Engl bark extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v.46, p.3182-3185, 2008.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v.25, p.1058-1071, 1986.

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, p.561-567, 2001.

SOUSA, P.S. et al. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**, Fortaleza: Editora da UFC, 1991.

SRIVASTAVA, A.; SHIVANANDAPPA, T. Hepatoprotective effect of the root extract of *Decalepis hamiltonii* against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. **Food Chem.**, v.118, p.411-417, 2010.

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

UETRECHT, J. Idiosyncratic drug reactions: Current understanding. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.47, p.513-539, 2007.

WALGREN, J. L.; MITCHELL, M.D; THOMPSON, D.C. Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. **Crit. Rev. Toxicol.**, v.35, p.325-361, 2005.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.**, v.74, p.139-162, 1994.

ZHANG, L.X.; COONEY, R.V.; BERTRAM, J.S. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship 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. (Ed). **Diseases of the liver**. Philadelphia: JB Lippincott, 1998. p.973-1964.