

ELIANA CARLA GOMES DE SOUZA

EFEITO DE BIXINA SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS EM
RATOS

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de “Doctor
Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

ELIANA CARLA GOMES DE SOUZA

EFEITO DE BIXINA SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS EM
RATOS

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de “Doctor
Scientiae”.

APROVADA: 27 de novembro de 2001.

Prof^a Tânia Toledo de Oliveira
(Conselheira)

Prof^a Nilda de Fátima Ferreira Soares
(Conselheira)

Prof. Tanus Jorge Nagem

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta

Prof. Paulo César Stringheta
(Orientador)

"Nosso tempo está marcado pelas maravilhosas conquistas nos campos do entendimento e das aplicações técnicas dessas descobertas. Quem não se regozijaria com isso? Mas não nos esqueçamos de que não são apenas o conhecimento e as habilidades que conseguem levar a humanidade a uma vida feliz e digna. A humanidade tem toda a razão em colocar os proclamadores dos altos valores e padrões morais acima dos descobridores de verdades objetivas."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e energia renovada de cada dia desta batalha.

Agradeço e ofereço ao meu pai, pelo cultivo da minha fé, pelo incentivo e pela generosa bondade, próprios de pessoas iluminadas, e mesmo não estando fisicamente presente é fonte inesgotável de inspiração e à minha mãe, sempre presente e com palavras sempre oportunas nos momentos mais difíceis.

Às minhas irmãs, Goretti, Tânia, Cíntia e Lílian, pelo amor, pelos conselhos e pela convivência insubstituível.

Ao meu companheiro de todas as jornadas, Sérgio Pereira Braz, divisor de tristezas, alegrias e acima de tudo, muito amor.

Aos meus sobrinhos, Carolina, Daniela, Camila, Victor e Luiz Guilherme, pela alegria proporcionada e que este trabalho lhes sirvam de inspiração.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Paulo César Stringheta, pela orientação, pela atenção e pela compreensão.

À Prof^ª Tânia Toledo de Oliveira, pelas concessões, pela confiança e pelas sugestões.

À Prof^ª Nilda de Fátima Ferreira Soares pela atenção e valiosas sugestões.

Aos Professores Tanus Jorge Nagem e Sérgio Luis Pinto da Matta, pelas sugestões.

À Cíntia Maria Chagas de Carvalho, amiga de todas as horas.

Ao José Francisco Silva, pela valiosa contribuição e pela disponibilidade.

À Silvana Lages Ribeiro Garcia, pela amizade e imensa contribuição nas análises estatísticas.

Aos funcionários do Biofármacos, do Laboratório de Pigmentos e Secagem e secretárias do Departamento de Tecnologia de Alimentos, especialmente ao José Geraldo Pinto, sem os quais seria mais difícil essa jornada.

Aos alunos de pós-graduação e estagiários do Biofármacos e Laboratório de Pigmentos e Secagem, cujos nomes foram omitidos para se evitar exaltados e excluídos, agradeço pela colaboração e convívio.

A todos amigos e outros que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Eliana Carla Gomes de Souza, filha de Luiz Carlos Gomes de Souza e Maria de Arruda Gomes de Souza, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em dois de janeiro de 1969.

Ingressou no curso de Nutrição em 1988, na Universidade Federal de Viçosa, onde se graduou em janeiro de 1993.

Em 1994, iniciou o curso de Mestrado em Agroquímica e concluiu em 1996.

Em 1997, iniciou o curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, defendendo tese em 2001.

CONTEÚDO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Toxicologia.....	3
2.1.1. Parâmetros para o diagnóstico usados em testes toxicológicos	9
2.1.1.1. Albumina	9
2.1.1.2. Alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)	10
2.1.1.3. Bilirrubina.Direta.....	13
2.1.1.4. Cálcio.....	14
2.1.1.5. Colesterol	15
2.1.1.6. Creatinina	17
2.1.1.7. Fósforo	18
2.1.1.8. Glicose	19

2.1.1.9. Triacilglicerol	20
2.1.1.10. Proteínas	21
2.1.1.11. Uréia	22
2.2. Histórico do uso de corantes	23
2.3. Avaliação toxicológica de corantes naturais	25
2.4. Carotenóides	26
2.4.1. Biossíntese de carotenóides	28
2.4.2. Absorção de carotenóides	28
2.4.3. Efeitos farmacológicos de carotenóides	31
2.5. Urucum	37
2.5.1. Propriedades toxicológicas e farmacológicas	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1. Caracterização do extrato..	47
3.2. Primeiro ensaio biológico – Toxicologia Crônica	48
3.2.1. Avaliação comportamental dos animais	50
3.2.2. Dosagens dos parâmetros bioquímicos	50
3.3. Segundo ensaio biológico – Tolerabilidade Cutânea	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1. Caracterização do extrato	59
4.2. Primeiro ensaio biológico – Toxicologia Crônica	61
4.2.1. Avaliação comportamental dos animais	61
4.2.2. Dosagens bioquímicas	65
4.2.2.1. Colesterol	65
4.2.2.2. Triacilglicerol	68
4.2.2.3. Albumina	71
4.2.2.4. Creatinina	75
4.2.2.5. Uréia	78
4.2.2.6. Glicose	81
4.2.2.7. Cálcio	84

4.2.2.8. Fósforo	87
4.2.2.9. Relação Ca:P	91
4.2.2.10. Bilirrubina Direta	94
4.2.2.11. Proteína	97
4.2.2.12. Aspartato aminotransferase	100
4.2.2.13. Alanina aminotransferase	103
4.3. Segundo ensaio biológico – Tolerabilidade Cutânea	107
5. RESUMO E CONCLUSÕES	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
APÊNDICE	120

RESUMO

SOUZA, Eliana Carla Gomes. D.S., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2001. ***Efeito de bixina sobre os parâmetros bioquímicos séricos em ratos***. Professor Orientador: Paulo César Stringheta. Professores Conselheiros: Tania Toledo de Oliveira e Nilda de Fátima Ferreira Soares

A bixina é muito utilizada na indústria de alimentos como corante, principalmente na forma de extratos que a contém. Com o objetivo de identificar os efeitos da bixina sobre os parâmetros bioquímicos séricos, foi conduzido um ensaio biológico, com 96 ratos (48 machos e 48 fêmeas) (*Rattus norvergicus*), variedade albinus, da raça Wistar, recém-desmamados, com 24 dias de idade. Os animais foram distribuídos em quatro grupos de 24, sendo que o grupo 1 não recebeu a substância-teste, os outros três grupos receberam a substância-teste que era um corante utilizado na indústria de alimentos que contém 28% de bixina; grupo 2 (70 mg), o grupo 3 (350 mg) e o grupo 4 (700 mg). Eles receberam água e alimento “ad libitum”, a temperatura ambiente variando entre 20 e 24 °C e com iluminação controlada com 12 horas de claro e escuro por um período de cento e oitenta dias. A administração do extrato foi feita diariamente, por via oral, misturada à ração. O extrato foi caracterizado através da determinação dos teores de proteína (5,33%), cinzas (2,04%), umidade (5,49%), extrato etéreo (50,49%), pH (2,62%), ponto de fusão (180°), teor de bixina após 12 meses sob refrigeração (20,8%). Pelo primeiro ensaio

biológico foi verificado que a bixina tem efeito hipocolesterolêmico em fêmeas e em machos reduziu os níveis de triacilgliceróis, teve efeito hiperglicemiante nas fêmeas (3^o mês), embora os níveis do grupo controle, tanto de machos quanto de fêmeas, estivessem alto devido à anestesia com éter realizada para sacrificar os animais. Houve alteração nos níveis séricos de fósforo nos grupos das fêmeas no 6^o mês, também quanto à relação Ca:P houve alteração nos grupos das fêmeas. Os níveis de AST e ALT encontraram-se aumentados, inclusive no grupo controle de ambos os sexos, devido à intoxicação por cobre, a bixina mostrou-se capaz de ajudar a regenerar as lesões hepáticas. Os níveis de uréia e creatinina também se mostraram alterados, talvez devido à intoxicação por cobre que pode ter levado a uma disfunção renal, interferindo no balanço nitrogenado. No segundo ensaio, onde foi feito o teste de tolerabilidade cutânea, foram comparados os sítios de aplicação da bixina com os sítios controles e pode-se verificar que não houve alterações cutâneas relativas à eritema, escaras e edema em nenhum dos tempos observados. Diante dos parâmetros avaliados podemos concluir que a substância não apresentou nenhuma alteração tóxica e teve efeitos farmacológicos.

ABSTRACT

SOUZA, Eliana Carla Gomes. D.S., Universidade Federal de Viçosa, november, 2001. **Bixin effect on the serum parameters biochemical in mice**. Adviser: Paulo César Stringheta. Committee Members: Tania Toledo de Oliveira and Nilda de Fátima Ferreira Soares

The bixin is very used in the industry of foods as coloring, mainly in the form of extracts that contains her. With the objective of identifying the bixin effects on the serum biochemical parameters, a biological assay was led, with 96 mice (48 males and 48 females) (*Rattus norvergicus*), variety albinus, of the race Wistar, recently-weaned, with 24 days of age. The animals were distributed in four groups of 24, and the group 1 didn't receive to substance-test, the other three groups received to substance-test that was a color used the industry of foods that contains 28% of bixin; group 2 (70 mg), the group 3 (350 mg) and the group 4 (700 mg). They received water and feed " ad libitum ", the temperature adapts varying between 20 and 24 0C and with illumination controlled with 12 hours of clearing and darkness by a period of hundred and eighty days. The administration of the extract was made daily, orally, mixed to the commercial feed. The extract was characterized through the determination

of the protein level (5,33%), ashes (2,04%), humidity (5,49%), ethereal extract (50,49%), pH (2,62%), coalition point (1800), bixin concentration after 12 months under refrigeration (20,8%). For the first biological assay it was verified that the bixin has effect hipcholesterolemic in females and in males it reduced the triacylglycerol levels, had effect hyperglycemic in the females (3^o month), although the levels of the group control, so much of males as of females, they were loud due to the anesthesia with ether accomplished to sacrifice the animals. There was alteration in the serum phosphorus levels in the groups of the females in the 6^o month, also with relationship to the relationship Ca:P there was alteration in the groups of the females. The levels of AST and ALT were increased, besides in the group control of both sexes, due to the intoxication for copper, the bixin was shown capable to help to regenerate the hepatic lesions. The urea levels and creatinin she also showed altered, perhaps due to the intoxication for copper that might have taken to a renal dysfunction, interfering in the nitrogen balance. In the second assay, where it was made the test of cutaneous tolerability, the sites of application of the bixin were compared with the sites controls and it can be verified that there were not relative cutaneous alterations to the erythema, escaras and edema in none of the observed times. Before the appraised parameters we can conclude that the substance didn't present any toxicant alteration and had effects farmacologics.

INTRODUÇÃO

O interesse pelos corantes naturais vem aumentando, devido à questionável inocuidade dos corantes artificiais (NAZÁRIO, 1989).

Mesmo com o avanço tecnológico, a substituição dos corantes sintéticos por naturais está condicionada a vários aspectos, como toxicológico, tecnológico e avaliação mercadológica.

A maioria das substâncias químicas consideradas agentes tóxicos é substâncias exógenas referidas como xenobióticos. Entretanto, compostos endógenos e mesmo elementos essenciais, quando administrados em doses elevadas são tóxicos (SALGADO e FERNÍCOLA, 1989).

Testes toxicológicos realizados em vários países, com vigilância da Organização Mundial de Saúde (OMS), comprovaram que, dependendo do tipo e da quantidade consumida, os corantes podem provocar extensa gama de efeitos colaterais, como alergias, disritmias cardíacas, problemas circulatórios, gástricos e oftalmológicos, distúrbios da tireóide, câncer e mutações gênicas. O debate em torno do uso desses aditivos concentra-se, sobretudo, nos corantes sintéticos.

Cerca de 7000 toneladas de sementes de urucum são usadas anualmente como corantes de alimentos em todo o mundo e, assumindo que o teor médio de bixina nessas sementes é de 2%, são consumidas 140 toneladas de bixina por ano (HENDRY, 1996).

O Brasil é um grande produtor de corantes naturais, destacando-se entre eles o urucum, que devido ao solo bastante propício para o plantio, torna-se um dos maiores produtores mundiais e a sua comercialização no mercado externo vem crescendo dia-a-dia (YABIKU, 1989).

De 1975 até 1994, a cultura do urucuzeiro, no Brasil, saiu da forma extrativista para a cultura racional e o país passou de pequeno produtor de grãos para exportador de corantes (OLIVEIRA, 1996).

O uso de corantes de urucum só não é maior no Brasil, por falta de melhor qualidade nos produtos, por falta de conhecimento de como aplicá-lo pela indústria alimentícia, por falta de exigência do consumidor final e pela legislação (OLIVEIRA, 1989). A legislação restringe o uso deste corante.

Em virtude da escassez de dados toxicológicos para inúmeras substâncias presentes nos alimentos e da necessidade de se estabelecer valores de IDA (Ingestão Diária Aceitável), foram criados valores temporários denominados de provisórios. À medida que novos dados toxicológicos são obtidos, esses valores vão sendo alterados, convenientemente (MIDIO e MARTINS, 2000).

Como o uso da bixina na indústria de alimentos está condicionado a dados toxicológicos, fez-se necessário a realização deste trabalho para dar subsídios à avaliação pelo Codex para que a bixina não tenha seu uso ainda mais restrito.

Desta forma, o presente trabalho objetiva avaliar o efeito da bixina sobre os parâmetros bioquímicos séricos, com base em ensaio toxicológico.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar os parâmetros bioquímicos, quanto:
 - o Ao efeito das doses de bixina
 - o Ao efeito do sexo
 - o Ao efeito do tempo

2 - REVISÃO DE LITERATURA:

2.1 - TOXICOLOGIA

A palavra toxicologia tem sua origem no grego "toxicon", que significa "arco". As flechas envenenadas foram, possivelmente, uma das primeiras aplicações intencionais de substância tóxica ao homem (SALGADO e FERNÍCOLA, 1989).

Toxicologia é um ramo da ciência que estuda as substâncias nocivas à saúde, suas ações, seus sintomas e efeitos. Desde as mais remotas eras o homem, utilizando-se de produtos vegetais, minerais e animais como medicamento ou alimento, começou a dar importância a seus efeitos e utilizar os que possuíam ação fulminante para eliminarem seus inimigos (BRITO FILHO, 1988).

A história da Toxicologia acompanha a própria história da civilização. Um dos documentos mais antigos, o Papiro de Ebers (1500 a.C.), registra uma lista de cerca de 800 ingredientes ativos, incluindo metais do tipo chumbo e cobre, venenos de animais e diversos vegetais tóxicos (OGA, 1996).

Na França, no fim do século XVI, surgiram os primeiros dispositivos legais determinando a presença de peritos nos casos suspeitos de envenenamento (ALCÂNTARA, 1985).

Após a Segunda Guerra Mundial, a Toxicologia experimentou notável desenvolvimento, principalmente a partir da década de 60, deixando de ser a ciência envolvida apenas com o aspecto forense. Hoje a ênfase é voltada à avaliação da segurança e risco na utilização de substâncias químicas, como também à aplicação de dados gerados em estudos toxicológicos como base para o controle regulatório de substâncias químicas no alimento, no ambiente, nos locais de trabalho, entre outros (OGA, 1996).

É fundamental conhecer as fases que antecedem o aparecimento dos efeitos tóxicos, ou seja, a fase de exposição, a fase toxicocinética e a fase toxicodinâmica. A fase toxicocinética corresponde à absorção, distribuição, biotransformação, acumulação e eliminação do agente químico. A substância química, uma vez absorvida pelo organismo, interage com moléculas específicas e provoca desde leves desequilíbrios até a morte, caracterizando assim, a fase toxicodinâmica. A fase clínica corresponde ao aparecimento de sinais e sintomas que caracterizam os efeitos tóxicos e evidenciam a ocorrência do fenômeno da intoxicação (SALGADO e FERNÍCOLA, 1989), como visto na Figura 1.

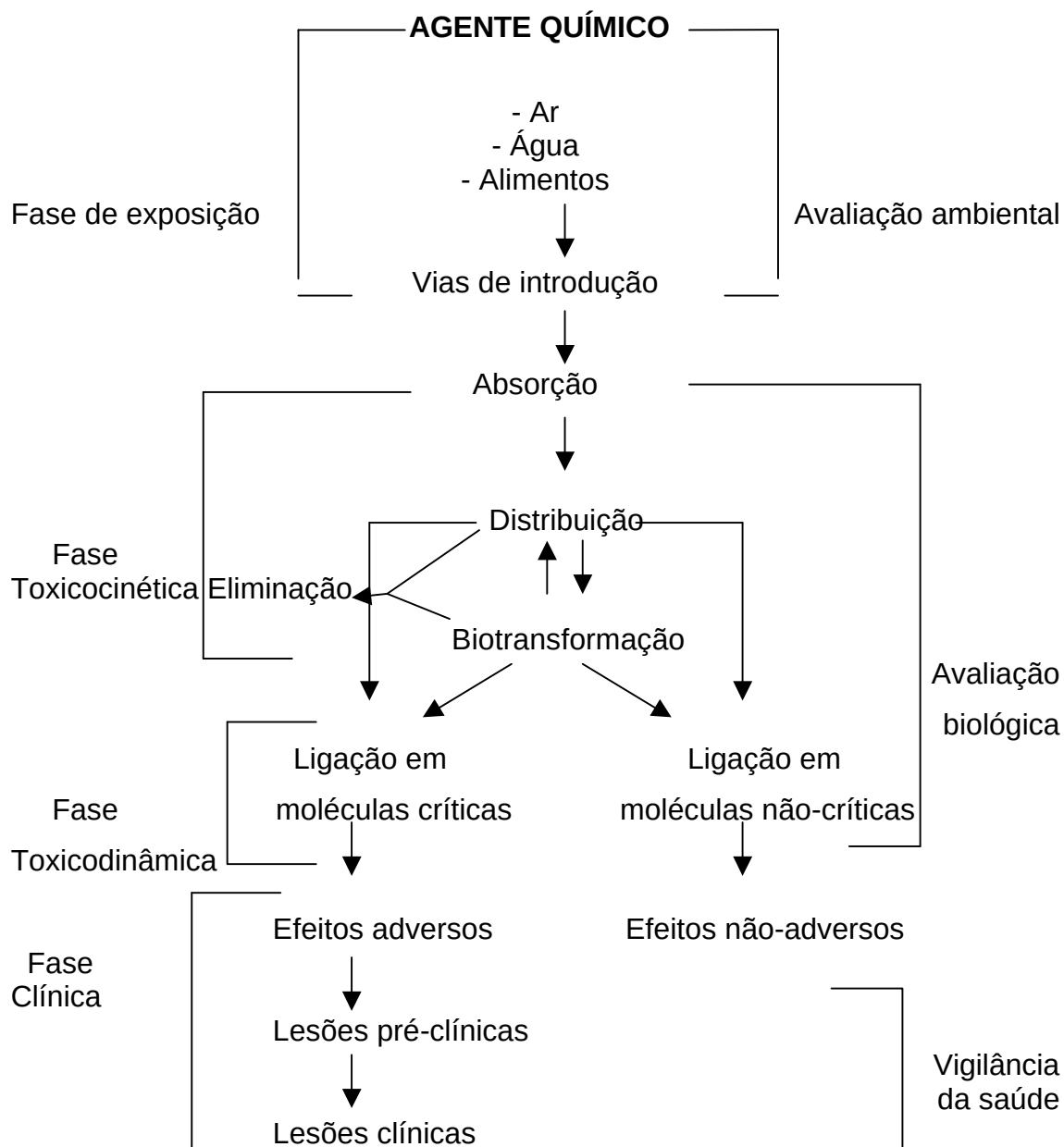


Figura 1 – Fases dos agentes químicos desde a ingestão até a intoxicação

Fonte: SALGADO e FERNÍCOLA, 1989.

Alguns conceitos são importantes no estudo da toxicologia. **Dose** corresponde à quantidade de substância química introduzida por uma das vias, seja oral, dérmica, subcutânea, intravenosa, intramuscular e intraperitonal. **Efeito** corresponde às alterações bioquímicas, morfológicas e/ou fisiológicas, produzidas pela exposição à substância química. **Resposta** indica a proporção da população que manifesta um determinado efeito definido. Na realidade, corresponde à taxa de incidência do efeito (SALGADO e FERNÍCOLA, 1989). Para assumir que um risco seja aceitável deve-se considerar a relação dose/efeito e/ou dose/resposta, isto é, a relação entre a intensidade da exposição (dose ou concentração) com o efeito assim como com a resposta da população exposta (OGA, 1996).

O conhecimento da toxicidade das substâncias químicas é obtido através de experimentações laboratoriais utilizando-se animais. Esses métodos básicos de pesquisa são empregados com todo critério científico e nunca realizados unicamente com a finalidade de se cumprir exigências legais, mas para fornecer informações relativas aos mecanismos das ações tóxicas, aos efeitos tóxicos e, principalmente, para se avaliar riscos que possam ser extrapolados ao homem. Essa extrapolação para o homem somente será possível, ainda com limitações, se forem seguidos alguns critérios básicos indispensáveis, durante a realização dos experimentos, como utilizar espécies e linhagens de animais que sejam susceptíveis à indução dos efeitos que se observar; utilizar a via de exposição mais comum para o homem; utilizar a substância química no estado físico e na forma química em que é encontrada nas exposições; e observar as possíveis ocorrências de efeitos secundários e doenças que possam surgir posteriormente (SALGADO e FERNÍCOLA, 1989).

Estudo de toxicidade crônica tem por objetivo caracterizar o perfil toxicológico de uma substância química administrada repetidamente a uma espécie de mamífero por longos períodos de tempo (BRITO, 1994). Efeitos crônicos caracterizam-se por serem produzidos por baixas concentrações (que isoladamente podem ser consideradas de não-efeito) e alta frequência (exposições prolongadas ou a longo prazo) (MIDIO e MARTINS, 2000).

A substância tóxica presente no alimento estará ou dissolvida na fração lipídica do alimento ou ligada à parte protéica ou, eventualmente, a carboidratos constituintes dos alimentos. Substâncias lipossolúveis serão prontamente absorvidas pelo trato gastrointestinal por simples difusão sem gasto de energia e a favor de um gradiente de concentração, enquanto que as hidrossolúveis poderão ser absorvidas dissolvidas na fração aquosa do alimento, ainda pelos fenômenos da difusão (MIDIO e MARTINS, 2000).

Os agentes tóxicos lipossolúveis, para serem facilmente excretados pelas vias renais, devem ser transformados em compostos mais polares, ou seja, solúveis em água, pois caso contrário, serão reabsorvidos. Esses produtos formados, além de serem menos lipossolúveis, são menos capazes de se ligarem às proteínas plasmáticas e às moléculas orgânicas. A maioria das reações de oxidação de agentes tóxicos é realizada pela chamada fração microsomal, localizada no interior das células, associada ao sistema Citocromo P-450, que recebem essa denominação porque, ao se combinarem com o monóxido de carbono, apresentam absorção máxima no comprimento de onda de 450 nm (SALGADO e FERNÍCOLA, 1989).

Em nossa dieta, ainda que perfeitamente natural, consumimos diariamente um grande número de substâncias tóxicas. Algumas são componentes químicos do próprio alimento, contaminantes de origem microbiana e produtos de degradação, devido a reações químicas ocorridas durante o processamento. É conveniente ressaltar que a toxicidade não é determinada somente pelas propriedades químicas e biológicas do composto, mas também pela concentração que se encontra e pelo tempo de exposição (WONG, 1989).

Os ensaios realizados com animais de laboratório não podem proporcionar uma prova irrefutável da inocuidade ou da natureza tóxica ou cancerígena de uma determinada substância para a espécie humana. Sem dúvida, as ações cancerígenas conhecidas de certas substâncias químicas no homem são análogas em muitos aspectos às que são observadas nos animais de laboratório, portanto, é regulamentado que se faça testes em animais de laboratório (SCHMIDT e LABUZA, 1992).

Existe uma série de vantagens em se usar pequenos animais em pesquisa, tais como o baixo custo, que se deve à quantidade de ração consumida, menor espaço requerido para acomodação dos animais e facilidade de higienização. Muitas dietas usadas em pesquisa são preparadas com ingredientes purificados que são caros, mas em se tratando de pequenos animais, como o requerimento é pequeno, pode-se tornar menos oneroso. Os resultados podem ser obtidos com animais de laboratório em menor tempo do que com animais maiores. O pequeno animal tem pequeno ciclo reprodutivo e de vida. O rato vive menos que três anos, e dez dias na vida de um rato é aproximadamente equivalente a um ano de vida humana (ALEXANDER et al., 1984).

No início do século vinte, os ratos rapidamente começaram a ser usados em pesquisa de nutrição, quando sua similaridade nutricional com animais monogástricos maiores e o homem foi reconhecida. Seu extensivo uso em experimentos continuou, devido ao fato de que o requerimento de nutrientes do rato é conhecido mais detalhadamente do que o requerimento de outros animais de laboratório. Os ratos têm hábitos noturnos e o seu crescimento e ganho de peso diminuem após cerca de 100 dias, mas o crescimento dos ossos tem sido observado até em 1000 dias, que excedem a média de vida de 700 dias (ARRINGTON, 1972).

Existem particularidades quanto ao metabolismo dos ratos; um deles se refere à inexistência da vesícula biliar e à incapacidade de regurgitação, não podendo, portanto, vomitar (ARRINGTON, 1972). Segundo MAHFOUZ & KUMMEROW (2000) os ratos são capazes de proteger o tecido hepático da oxidação e eliminar um possível aumento da peroxidação de lipídios e oxisteróis, que podem ser secretados nas lipoproteínas do fígado para a circulação. Isso indica que os ratos são menos sensíveis que outros animais utilizados em experimento, como o coelho, quanto aos efeitos aterogênicos de uma dieta hipercolesterolêmica.

2.1.1. PARÂMETROS PARA O DIAGNÓSTICO USADOS EM TESTES TOXICOLÓGICOS

Mudanças na química do sangue são associadas com muitas doenças e a química quantitativa clínica tem sido uma parte integrante do estudo das funções do corpo em ambos, saúde e doença (ALEXANDER et al., 1984).

2.1.1.1. – ALBUMINA

Como a albumina sérica é sintetizada no fígado, sua determinação constitui, no contexto do hepatograma, um dado de grande valor para o diagnóstico e o prognóstico das doenças hepáticas (BACILA, 1980). As principais funções da albumina são o seu papel na regulação osmótica e o transporte de diversas substâncias, muitas das quais são pouco solúveis em água (SMITH et al., 1988).

É de suma importância o conhecimento do transporte dos medicamentos pelas proteínas plasmáticas, sobretudo pela albumina, seja devido à possibilidade do deslocamento de materiais endógenos pelas proteínas plasmáticas, ou ainda por causa da competição mútua dos medicamentos em relação às proteínas de transporte, levando a reações de intolerância e a manifestações de superdosagem, no caso de medicação combinada (KÜHN e LASCH, 1977). Calcula-se que a albumina contenha seis sítios de ligação para substâncias exógenas (xenobióticos) e/ou endógenas (MIDIO e MARTINS, 2000).

Diminuições na concentração de albumina ocorrem nas doenças crônicas (cirrose), na síndrome nefrótica, em casos de perdas maciças de albumina, na artrite reumatóide, em casos de baixa ingestão protéica e após hemorragia grave (ANALISA, 1999).

O principal sintoma da hipoalbuminemia é o edema (MURRAY et al., 1998).

2.1.1.2. ALANINA AMINOTRANSFERASE e ASPARTATO AMINOTRANSFERASE

A alanina aminotransferase ou transaminase glutâmico-pirúvica (GPT/TGP) é uma enzima encontrada predominantemente no fígado, em concentração moderada nos rins e em menores quantidades no coração e nos músculos esqueléticos. Na célula hepática, ela localiza-se no citoplasma (90%) e na mitocôndria (10%). Qualquer lesão tissular ou doença afetando o parênquima hepático liberará uma maior quantidade da enzima para a corrente sangüínea, elevando a concentração sérica. Em geral, as causas mais comuns de elevação da alanina aminotransferase no sangue ocorrem por disfunção hepática. Desta maneira, além de ser sensível, ela é também bastante específica para o diagnóstico de doença hepatocelular (BACILA, 1980; ANALISA, 1999).

As transaminases transferem o grupo NH_2 dos aminoácidos para α -cetoglutaricos

A alanina aminotransferase catalisa a reação:

Ácido pirúvico + ácido glutâmico . alanina + ácido α -cetoglutarico

A aspartato aminotransferase catalisa a reação:

Ácido oxalacético + ácido glutâmico . ácido aspártico + ácido α -cetoglutarico

Na reação de transaminação, inicialmente, o grupo amino de um aminoácido é transferido ao piridoxal fosfato, que é convertido a piridoxamina fosfato; que, a seguir, é doado ao α -cetoglutarato, produzindo glutamato (MARZZOCO e TORRES, 1999).

Convém ressaltar que uma lesão tecidual nos rins, coração e nos músculos esqueléticos também provocam maior liberação da alanina aminotransferase para a corrente sangüínea, elevando seus níveis séricos. Assim, diante de um quadro clínico de miosite, os valores dessa enzima podem elevar-se tanto quanto na hepatite virótica aguda (ANALISA, 1999). A atividade

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

A aspartato aminotransferase é uma enzima encontrada em concentração muito alta no músculo cardíaco, no fígado, músculos esqueléticos e em menor concentração nos rins e pâncreas. Nas células hepáticas, ela localiza-se no citoplasma (40%) e na mitocôndria (60%). Qualquer lesão tissular ou doença afetando o parênquima hepático liberará uma maior quantidade da enzima para a corrente sangüínea, elevando seus níveis séricos (BACILA, 1980; ANALISA, 1999).

Na hepatite virótica, a concentração da aspartato aminotransferase encontra-se quase sempre elevada em mais de 10X o limite superior da faixa de referência e em alguns casos ultrapassa a 20X esse limite de normalidade. Entretanto, dentro de uma a duas semanas, os valores diminuem bastante podendo cair para a faixa normal ou apresentar ligeiro aumento. Nos casos de obstrução extra-hepática, as elevações não são comuns, mas podem ocorrer quando há lesão parenquimatosa secundária aguda. Na cirrose, as alterações da aspartato aminotransferase e seus respectivos níveis vão depender da ocorrência e do grau de lesão hepatocelular ativa presente. Geralmente, na cirrose inativa os valores não se alteram. Na cirrose alcoólica ativa, os valores se elevam moderadamente (ANALISA, 1999).

Na hepatite virótica crônica ativa, a concentração da aspartato aminotransferase também se encontra elevada moderadamente. Várias doenças comuns apresentam elevação pequena ou moderada, e entre elas podemos citar: mononucleose infecciosa, hepatite aguda na fase de remissão ou recuperação, hepatite crônica, disfunção hepática induzida por drogas, tumor hepático metastático, congestão hepática passiva, cirrose ativa ou hepatopatia alcoólica, obstrução extra-hepática prolongada do ducto biliar, fígado gorduroso e citomegalovírus (ANALISA, 1999).

Na maioria das vezes, a dosagem de aspartato aminotransferase (AST) é realizada juntamente com a alanina aminotransferase (ALT) e a relação AST/ALT pode ser determinada para auxiliar no diagnóstico diferencial das

doenças. Assim, a relação AST/ALT é sempre maior que um em pacientes com cirrose alcoólica, hepatites crônicas, congestão hepática e tumor metastático do fígado. Geralmente, essa relação é menor do que um nos casos de hepatite virótica aguda e mononucleose infecciosa. Nos casos de lesão do miocárdio, a AST juntamente com a dosagem da creatina quinase (CK) e da desidrogenase láctica (LDH) é muito útil para o diagnóstico e acompanhamento do infarto do miocárdio. Cerca de 80% da AST dos hepatócitos é mitocondrial, enquanto a ALT é citoplasmática. Essa diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas. Em dano hepatocelular leve a forma predominante do soro é a citoplasmática, enquanto que em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT (ANALISA, 1999).

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

2.1.1.3. BILIRRUBINA

Em condições fisiológicas no adulto humano, $1-2 \times 10^8$ eritrócitos são destruídos por hora. Assim, em um dia, um homem de 80 Kg renova aproximadamente 6g de hemoglobina. Quando a hemoglobina é destruída no corpo, a porção protéica, globina, pode ser reutilizada, seja como tal ou na forma de seus aminoácidos constituintes, e o ferro do heme passa para o reservatório de ferro, também para ser reutilizado. Contudo, a porção porfirínica, livre de ferro, do heme é degradada, principalmente nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e medula óssea. Estima-se que 1g de hemoglobina produz 35mg de bilirrubina (MURRAY et al., 1998).

A bilirrubina se liga firmemente à albumina e à α_2 -globulina no plasma e, desse modo, é transportada pelo sangue, de onde é removida pelas células macrofágicas do fígado, na forma principal de conjugado com o ácido glicurônico, produzindo a forma solúvel de glicuronato de bilirrubina que é excretada para a bile (BACILA, 1980).

Com base na determinação quantitativa, no soro, da bilirrubina direta é possível estabelecer dados úteis para a caracterização de alterações do funcionamento hepático, já que em determinadas condições pode ocorrer aumento de concentração no sangue circulante tanto do glicuronato de bilirrubina como da bilirrubina livre (BACILA, 1980).

Fisiologicamente, certas variações do conteúdo de bilirrubina ocorrem no período de 24 horas. O jejum aumenta sua concentração no sangue, de tal modo que os valores mais elevados são encontrados pela manhã, antes de qualquer alimentação. Patologicamente, a hiperbilirrubinemia ocorre, sobretudo nas circunstâncias seguintes: lesão difusa do parênquima hepático (hepatite tóxica e infecciosa, cirrose), obstrução dos canais biliares e hemólise excessiva (LIMA et al., 1985).

Na hiperbilirrubinemia, a bilirrubina se difunde para os tecidos que, então, se tornam amarelados. A condição descrita é denominada icterícia ou icterus (MURRAY et al., 1998).

2.1.1.4. CÁLCIO

O cálcio está presente no organismo em quantidades maiores do que qualquer outro elemento mineral. Cerca de 99% do cálcio do organismo está no esqueleto, a pequena quantidade de cálcio restante está nos fluidos do organismo, onde ele se encontra em parte ionizado.

O principal sal de cálcio ingerido é o fosfato de cálcio, pois é nesta forma que o cálcio se encontra presente nos produtos alimentares. Na natureza o cálcio também se encontra na forma de sais de carbonato, tartarato ou oxalacetato e, em associação com o magnésio na forma do sal misto altamente insolúvel de ácido fítico. Do ponto de vista nutricional, a absorção intestinal de Ca^{+2} representa um sério problema, devido, em grande parte, à insolubilidade da maioria de seus sais (SMITH et al., 1988).

O cálcio é importante na coagulação do sangue, na manutenção da excitabilidade normal do coração, músculos e nervos, nos aspectos diferenciais da permeabilidade de membrana e na adesão celular (HARPER et al., 1982).

O cálcio ionizado do soro é mantido homeostaticamente dentro de limites muito estreitos, de modo que a ocorrência de pequenas alterações de apenas 1% desencadeiam a operação de mecanismos destinados a restabelecer esses valores basais. Tais mecanismos envolvem um compartimento de depósito, o esqueleto, que pode ser solicitado ou no qual pode ser depositado o excesso de cálcio, bem como a excreção do elemento pelos rins ou através da bile e intestino (SMITH et al., 1988).

A hipercalcemia é observada no hiperparatireoidismo, pelo uso de certos diuréticos, na hipervitaminose D, em neoplasias, especialmente quando há metástase osteolítica, na sarcoidose, na imobilização após fratura óssea, no hipertireoidismo, nas doenças de Hodgkin, de Addison, no transplantado renal, na osteíte fibrosa cística e na doença de Paget (LIMA et al., 1985).

A hipocalcemia é registrada no hipoparatireoidismo, deficiência de vitamina D, na insuficiência renal, na hipomagnesemia, na gravidez, na doença celíaca de adulto e na síndrome nefrótica (LIMA et al., 1985). O principal sintoma da hipocalcemia é o raquitismo (MURRAY et al., 1998).

2.1.1.5. COLESTEROL

O colesterol do organismo humano pode ser obtido através dos alimentos ou por síntese endógena. A síntese do colesterol ocorre, principalmente, no fígado e intestino. A acetil-CoA é precursora de todos os átomos de carbono presentes no colesterol (C_{27}), e o agente redutor é o mesmo da síntese de ácidos graxos, ou seja, NADPH. A via é composta por dezenas de reações, que podem assim serem sumarizadas: a acetil-CoA forma unidades de cinco carbonos, com estrutura semelhante ao isopreno, que se polimerizam em um intermediário linear, que, após ciclização, origina o colesterol (MARZZOCO e TORRES, 1999).

Os lipídios da dieta ganham a circulação sanguínea sob a forma de quilomícrons, sintetizados no intestino. Nos tecidos extra-hepáticos, os triacilgliceróis componentes dos quilomícrons são hidrolisados pela lipase lipoprotéica, fornecendo ácido graxo e glicerol. Os remanescentes dos quilomícrons, então enriquecidos de colesterol, são retirados da circulação pelo fígado. Os triacilgliceróis e o colesterol que excedem as necessidades dos próprios hepatócitos são utilizados para a síntese da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), que são, então, exportadas. Com a hidrólise dos triacilgliceróis pela lipase lipoprotéica, originam as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), que são enriquecidas de colesterol. Uma fração das IDL retorna ao fígado e o restante, após outro ciclo de remoção de triacilgliceróis pelos tecidos periféricos, origina as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que apresentam maior teor de colesterol. As lipoproteínas de alta densidade (HDL) atuam no sentido inverso ao das LDL, ou seja, efetuam a remoção de colesterol dos tecidos. Elas são sintetizadas no fígado e intestino como uma lipoproteína rica em proteína e contendo um teor relativamente baixo de colesterol (MARZZOCO e TORRES, 1999).

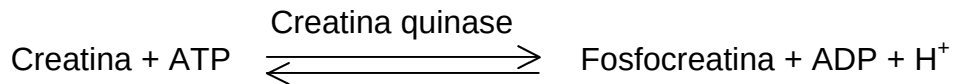
O colesterol encontra-se largamente distribuído em todas as células do organismo (HARPER et al., 1982). O colesterol pode ser encontrado livre ou como um complexo covalente com ácidos graxos ligados a um grupamento hidroxil, chamado de éster de colesterol. O colesterol é usado por alguns

organismos como um elemento estrutural de membrana e na síntese de sais biliares e hormônios esteroidais, incluindo aldosterona, cortisona, estrogênio, testosterona e vitamina D. (BRODY, 1993).

A hipercolesterolemia ocorre no diabetes, síndrome nefrótica, hipotireoidismo, nas moléstias do trato biliar, na anestesia pelo éter, na aterosclerose, xantomatoses, hiperlipidemia idiopática familiar, na osteoartrite hipertrófica, catarata senil e na psoríase. A hipocolesterolemia ocorre no hipertireoidismo, anemia perniciosa, anemia hemolítica, hepatite tóxica e virótica, doenças infecciosas agudas (pneumonia, febre tifóide), doença de Addison, tuberculose pulmonar grave, obstrução intestinal e na prostática, doença celíaca e nos estados caquéticos (LIMA et al., 1985).

2.1.1.6. CREATININA

A creatinina é intensamente formada no músculo pela remoção irreversível e não enzimática de água do fosfato de creatina (HARPER et al., 1982). A fosfocreatina é produzida nos períodos de repouso, por fosforilação da creatina à custa de ATP (MARZZOCO e TORRES, 1999), assim:



A fosfocreatina resulta da transferência de um grupo fosfato do ATP para a creatina (a creatina é sintetizada a partir da arginina, glicina e S-adenosilmetionina). Durante a contração muscular, a reação processa-se no sentido oposto. A fosfocreatina decompõe-se em creatinina, que não pode ser reaproveitada, sendo excretada na urina (MARZZOCO e TORRES, 1999).

A creatinina é o composto nitrogenado do sangue menos variável, sua taxa independe da ingestão de proteínas da alimentação e não é afetada pelo volume urinário (LIMA et al., 1985).

A constância na formação e excreção da creatinina faz dela um índice muito útil de função renal, principalmente de filtração glomerular. Em virtude de sua relativa independência de fatores como dieta, grau de hidratação e metabolismo protéico a determinação da creatinina plasmática é um teste de função renal mais seguro do que a uréia (ANALISA, 1999).

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

2.1.1.7. FÓSFORO

A quantidade de fosfato absorvido pelo intestino raramente ultrapassa 70% daquela ingerida (SMITH et al., 1988). Cerca de 85% do fosfato do corpo está nos ossos, com 14% nos tecidos e 1% nos fluidos extracelulares (BRODY, 1994).

O fosfato é ubíquo e abundante nos materiais biológicos. A maior parte do fosfato ingerido consiste em fosfato inorgânico (Pi) ou fosfato orgânico, que libera Pi no trato digestivo (SMITH et al., 1988).

Os fosfatos têm a capacidade de se combinar de modo reversível com muitos sistemas de coenzimas e, também, com numerosos outros compostos necessários ao funcionamento dos processos metabólicos (GUYTON, 1991).

Embora a insuficiência renal crônica e o hipotireoidismo sejam as duas causas mais comuns de hiperfosfatemia, várias condições podem causar hiperfosfatemia transitória e assintomática. Como o músculo se constitui no grande reservatório de fosfato é evidente que a rabdomiólise produz severa hiperfosfatemia. Outras condições que promovem a liberação do fosfato intracelular e levam a hiperfosfatemia incluem a hipertermia maligna e a quimioterapia antilblástica. Níveis diminuídos de fósforo são encontrados no hiperparatireoidismo e na intoxicação pelo chumbo (ANALISA, 1999).

2.1.1.8. GLICOSE

A glicose é o principal carboidrato no sangue, desempenhando nos tecidos o papel de um combustível metabólico principal (HARPER et al., 1982).

É o principal substrato oxidável para a maioria dos organismos. De fato sua utilização como fonte energética pode ser considerada universal e, dos microrganismos ao homem, quase todas as células são potencialmente capazes de atender suas demandas energéticas apenas a partir deste carboidrato. A glicose é imprescindível para algumas células e tecidos, como hemácias e tecido nervoso, por constituir o único substrato que estes tecidos são capazes de oxidar para obter energia (MARZZOCO e TORRES, 1999).

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

Certos estados emocionais (apreensão, ansiedade, medo) e o cigarro podem produzir elevação da concentração de glicose, provavelmente aumentando a glicogenólise hepática através de hipersecreção de epinefrina. A anestesia pelo éter, morfina e monóxido de carbono, asfixia, choque traumático, doença de Cushing, acromegalia, hipertireoidismo, traumatismo craniano, nos tratamentos prolongados com adrenocorticóides e ACTH e a pancreatite aguda também produzem hiperglicemia. A hipoglicemia pode ser provocada por anabolizantes orais, hipoglicemiantes orais, exagerado esforço muscular, hipotireoidismo, hipopituitarismo, distúrbios de absorção intestinal, tratamento desordenado com insulina ou com hipoglicemiantes orais e doença de Addison (LIMA et al., 1985).

Os sintomas da hiperglicemia são a poliúria, polidipsia e perda de peso (MURRAY et al., 1998).

2.1.1.9. TRIACILGLICERÓIS

Os lipídios são um grupo heterogêneo de biomoléculas, insolúveis em água, mas altamente solúveis em solventes orgânicos tais como éter e clorofórmio. São constituintes de membranas, são moléculas armazenadoras de energia e alguns têm atividade biológica. Eles são também encontrados em combinação com outras moléculas, como as proteínas (lipoproteínas) e carboidratos (glicolipídios) (ALEXANDER et al., 1984). Aportam entre 35 e 40% das calorias ingeridas por um adulto e são os componentes que se transformam em energia com maior eficácia (WONG, 1989).

Os lipídios contêm sempre carbono, hidrogênio e oxigênio, às vezes, nitrogênio e fósforo e raramente enxofre. São geralmente ésteres reais ou potenciais de ácidos graxos com álcoois mais ou menos complexos e por isso geralmente fornecem, por hidrólise, ácidos graxos. O grupo de substâncias classificadas como lipídios inclui, também, substâncias que não fornecem por hidrólise ácidos graxos, e por isso não poderiam ser consideradas lipídios no sentido restrito, possuindo, porém propriedades similares a estes e com eles tendo conexão de ordem biológica (LASZLO et al., 1986).

Os triacilgliceróis, chamados também de gorduras neutras, são ésteres do álcool glicerol com ácidos graxos (HARPER et al., 1982).

A mobilização do depósito de triacilgliceróis é obtida por ação da lipase dos adipócitos, uma enzima sujeita a regulação hormonal, que hidrolisa os triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol (MARZZOCO e TORRES, 1999).

A determinação dos triacilgliceróis ocupa lugar de destaque no laboratório clínico moderno porque é dado importante e necessário para a classificação e fenotipagem das hiperlipoproteinemias. É também de importância a íntima correlação que se observa entre a hipertrigliceridemia e o aumento do risco coronariano. As causas das elevações dos triacilgliceróis são as várias doenças chamadas hiperlipidemias ou hiperlipoproteinemias. As hiperlipidemias podem estar associadas a doença cardiovascular e ocorrem comumente no diabetes, alcoolismo, pancreatite, síndrome nefrótica, hipoparatiroidismo, e mieloma múltiplo (LIMA et. al., 1985).

2.1.1.10. PROTEÍNA

A proteína é composta por um polímero de aminoácidos (BRODY, 1993). A biossíntese de quase todas as proteínas do plasma é realizada no fígado, bem como o catabolismo da maior parte das proteínas plasmáticas. (KÜHN e LASCH, 1977).

Existe um constante estado de equilíbrio entre as proteínas plasmáticas, os aminoácidos do sangue circulante e as proteínas teciduais. Mesmo durante a inanição, ou na presença de doenças debilitantes graves, a relação entre as proteínas teciduais totais e as proteínas plasmáticas totais permanece relativamente constante em cerca de 33 para 1 (GUYTON, 1991).

A regulação normal dos níveis das proteínas plasmáticas se processa através da biossíntese, de modo que o aumento da concentração das proteínas do plasma sempre é consequência do ingresso destas proteínas na circulação sangüínea. A diminuição da concentração de determinada proteína no plasma sangüíneo é indicativo, quase sempre, de diminuição do volume de produção da mesma, a não ser que tenha ocorrido perda externa das proteínas plasmáticas (hemorragia, síndrome nefrótica, doenças intestinais) ou que algumas proteínas tenham sido consumidas no sangue circulante em virtude do aumento de velocidade do mecanismo de reação que lhes é específico (KÜHN e LASCH, 1977).

Algumas proteínas são transportadoras (a ceruloplasmina transporta o cobre; as haptoglobinas, a hemoglobina; as α e β -globulinas, os lipídios; as transferrinas, o ferro; a transcortina, o cortisol, etc.); outras funcionam como fator de coagulação, como anticorpos, como componentes do complemento e hormônios (LIMA et al., 1985).

A determinação das proteínas totais é útil para detecção de hiperproteinemia devido à hemoconcentração como nas desidratações e várias condições de hiperglobulinemia como mieloma múltiplo, infecções e enfermidades hepáticas. A hipoproteinemia pode ser observada em estados de má nutrição, enfermidades renais e processos malignos (ANALISA, 1999).

2.1.1.1.11. URÉIA

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

Os dois átomos de nitrogênio presentes na uréia são provenientes do NH_4^+ e aspartato, e o átomo de carbono, do bicarbonato. A síntese da uréia ocorre no fígado (MARZZOCO e TORRES, 1999).

Tem sua concentração afetada pela dieta e pelo estado de hidratação, constituindo uma indicação grosseira do estado da função renal. Valores aumentados da uréia plasmática são classificados como: causa pré-renal, resultante de defeitos de excreção e causa renal como consequência da doença renal aguda ou crônica com diminuição da filtração glomerular. Causas pós-renais, geralmente resultante de uma obstrução do trato urinário, podem ocorrer nas litíases renais e nos tumores por compressão da bexiga. A diminuição da uréia sérica ocorre apenas em poucas situações como na insuficiência hepática aguda e inanição (ANALISA, 1999). O fígado é o sítio da formação da uréia, mas a redução da azotemia somente ocorre nas lesões hepáticas muito extensas. A diminuição do teor de uréia é observada também no último trimestre da gravidez (LIMA et al., 1985).

2.2 - HISTÓRICO DO USO DE CORANTES

De acordo com ANGELUCCI (1991), dentre as percepções sensoriais do homem com sentidos normais, 87% são captadas pela visão, 9% pela audição e as demais, 4%, pelo olfato, paladar e tato. A percepção visual da cor não se restringe, tão somente, ao fato de o ser humano distinguir a radiação luminosa de distintos comprimentos de onda (de 390 a 750 nm), mas sim pelo estímulo captado pelo cérebro quando a luz penetra em um artefato da visão, logo um fenômeno psicofísico.

Os compostos responsáveis pela cor dos alimentos se caracterizam por ser um grupo de substâncias com estruturas diversas e com propriedades químico-físicas extremamente variadas. Em muitas dessas substâncias, suas propriedades como cromóforos podem explicar-se adequadamente somente com base na sua estrutura de orbitais moleculares (WONG, 1989).

O homem sempre coloriu os alimentos, às vezes até indiscriminadamente. Nos Estados Unidos, no fim do século passado, quando um corante não se adaptava para tingir tecidos, era empregado para colorir alimentos. A essa época, cerca de oitenta corantes eram utilizados em alimentos e bebidas sem regulamentos quanto à sua natureza e pureza (ANGELUCCI, 1989).

Em 1856, o pesquisador Sir William Henry Perkin, descobriu o primeiro corante extraído da malva (HALLAGAN, 1991). Com este advento, vários corantes passaram a ser sintetizados e designados como Corantes Artificiais ou Sintéticos, os quais eram utilizados nos alimentos com a finalidade de conferir cor ou repor a cor natural, perdida durante os processos de industrialização e/ou estocagem (MASCARENHAS, 1997).

Até 1884, quando a anilina passou a ser usada no mercado (MORTON, 1960), a maior parte dos corantes utilizados nos alimentos era natural. A partir dessa data, os corantes artificiais foram substituindo os naturais, devido à maior variedade de cores. Esse quadro permaneceu até próximo de 1950, quando pesquisas começaram apontar os efeitos maléficos do uso indiscriminado dos corantes artificiais (TIMBERLAKE e HENRY, 1986).

Em 1900, cerca de 80 corantes eram usados. Não havia nenhuma regulamentação quanto ao uso destes. Em 1906 foi feita a primeira legislação quanto ao uso de corantes, que foi o Pure Food and Drugs Act. Após um estudo sobre o uso de corantes em alimentos, somente cerca de sete corantes de composição conhecida, que tinham sido examinados fisiologicamente, tiveram resultados satisfatórios. Em 1938, o The Federal Food, Drug and Cosmetic Act criou uma lista com 15 corantes permitidos para o uso em alimentos, com base em estudos toxicológicos por 32 anos. Em 1960, Color Additive Amendments foi criado para corrigir a inflexibilidade do Ato de 1938, diminuindo os testes para 2 ½ anos (MEGGOS, 1984).

O novo ramo comercial se desenvolveu tanto que, em 1969, o Brasil já consumia 40 toneladas de corantes por ano e não detinha tecnologia para sua fabricação, ou seja, importava todos os sintéticos do Japão, Grã-Bretanha, Suíça, Estados Unidos e Alemanha (RODRIGUES, 1995).

Nas últimas décadas, tem-se observado uma tendência mundial em se substituir os corantes sintéticos pelos corantes naturais. Os corantes naturais estão sendo muito estudados no mundo inteiro. Em 1986, entre as 448 patentes, 356 se referem aos corantes artificiais e 21 dizem respeito às lacas, que são corantes que não são absorvidos pelo organismo humano (GUIMARÃES, 1994).

De acordo com a Resolução nº 34, de 09 de março de 2001, os corantes permitidos são cúrcuma, curcumina, riboflavina, riboflavina 5'-fosfato de sódio, tartrazina, amarelo crepúsculo, carmim, cochonilha, ácido carmínico, azorubina, ponceau 4R, vermelho 40, azul patente V, indigotina natural ou sintética, azul brilhante, clorofila, clorofilina, clorofila cúprica, clorofilina cúprica, caramelo I, II, III e IV, carvão vegetal, beta caroteno sintético, carotenos naturais, bixina, norbixina, capsantina, capsorubina, licopeno, beta-apo-8'-carotenal, éster metílico ou etílico do ácido beta-apo-8'-carotenóico, luteína, cantaxantina, vermelho de beterraba, betanina, antocianinas e dióxido de titânio.

Segundo RIZZO (1996), presidente da Associação Brasileira da Indústria de Aditivos e Melhoradores para Alimentos e Bebidas (ABIAM), no ano de 1995 e primeiro semestre de 1996, a produção de corantes naturais ficou estagnada.

2.3 - AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE CORANTES NATURAIS

A prática de colorir alimentos é muito antiga, porém a preocupação sobre a segurança desta prática é relativamente recente (NAZÁRIO, 1989).

O crescente uso de corantes diversos nos alimentos, determinou o estabelecimento de normas em diversos países, já desde o início deste século. As medidas legais vão desde a proibição de uso, ao uso livre de determinados corantes. Entre os dois limites extremos, há a permissão de uso, a par das justificativas de ordem tecnológica, condicionada à demonstração da segurança de uso através de ensaios toxicológicos em animais de laboratório e no homem (NAZÁRIO, 1989).

Segundo NAZÁRIO (1989), além dos centros nacionais que executam experimentações toxicológicas, há 3 instituições internacionais engajadas no estudo toxicológico de aditivos em alimentos:

- 1- JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, desde 1956. Este grupo toma decisões e faz recomendações aos países membros da FAO e da OMS.
- 2- IARC - International Agency for Research on Cancer, desde 1971. Este grupo avalia o risco carcinogênico das substâncias no homem.
- 3- Comitê Científico para Alimentos da CEE, desde 1974. Este grupo dá orientação, aos países membros, sobre problemas relacionados com a proteção da saúde e segurança das pessoas sobre o consumo de alimentos.

Por decisão do Conselho Nacional de Metrologia (CONMETRO) criou-se no Brasil, o Comitê Brasileiro do “Codex Alimentarius”, cuja Secretaria Executiva é exercida pelo Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial (INMETRO) e onde estão representados os Ministérios da Agricultura, Indústria e Comércio, Relações Exteriores e Saúde. Este Comitê acompanha as reuniões da Comissão do Codex Alimentarius e do Comitê do Codex sobre aditivos alimentares, cabendo aos delegados brasileiros a apresentação de relatórios informando a evolução dos trabalhos (PIRAGIBE, 1990).

2.4 – CAROTENÓIDES

Aproximadamente 600 carotenóides têm sido isolados de fontes naturais e suas estruturas têm sido caracterizadas (KHACHIK, et al., 1998). O esqueleto carbonado básico dos carotenóides consiste em unidades repetidas de isopreno (TAYLOR, 1992).

Formam um grupo de substâncias com a estrutura altamente insaturada de hidrocarbonetos terpênicos e podem conter grupos hidroxilas, carbonilas e carboxilas. Nestes casos são denominados xantofilas. Devido à sua composição, são solúveis em lipídios e seus solventes. A solubilidade varia com a presença e número de grupos oxigenados como hidroxilas, carboxilas e neste caso a solubilidade em solventes apolares é diminuída (BOBBIO e BOBBIO, 1992b).

Os carotenóides formam um dos grupos de pigmentos mais difundidos na natureza (BOBBIO e BOBBIO, 1992a) e são encontrados nos cloroplastos de tecidos verdes, mas sua cor é mascarada pela clorofila (BRITTON, 1996), em flores, frutas e alguns animais. A função dos carotenóides é simplesmente fornecer cor (HENDRY, 1996) e são responsáveis pela coloração amarela, laranja e vermelha (BRITTON, 1996).

Nas plantas, os carotenóides estão complexados com proteínas do cloroplasto em folhas e outros tecidos verdes e do cromoplasto em frutas e vegetais maduros. Além disso, os carotenóides das frutas estão esterificados com ácidos graxos. Os carotenóides, quando formam complexos com proteínas, sofrem mudanças na cor natural do carotenóide livre. Esses complexos conferem maior estabilidade ao pigmento (BOBBIO e BOBBIO, 1992b).

Todos os organismos fotossintéticos contêm um ou mais pigmentos orgânicos capazes de absorver a radiação visível, que iniciará as reações fotoquímicas da fotossíntese. Em plantas superiores, os principais pigmentos fotossintéticos são os carotenóides e as clorofilas (TAIZ e ZEIGER, 1998). Os carotenóides estão localizados nas membranas tilacóides do cloroplasto, no complexo pigmento-proteína, onde eles servem como um acessório captador

de energia (principalmente as xantofilas). São importantes também como protetores da fotoxidação pelo oxigênio simpleto (FRANK e COGDELL, 1993).

Estima-se que a natureza produz mais de 100 milhões de toneladas de carotenóides por ano (MASCARENHAS, 1997).

No plasma humano predominam o β -caroteno e o licopeno. Os carotenóides mais comumente encontrados nos alimentos vegetais são β -caroteno (cenoura), licopeno (tomate), várias xantofilas - zeaxantina, luteína e outras estruturas oxigenadas do milho, da manga, do mamão e a bixina (aditivo culinário e corante dérmico usado por indígenas amazônicos, obtido do urucum). Outras ocorrências naturais de uso culinário são a capsaxantina e a capsorubina (páprica), excepcionalmente solúvel em água e um dos raros glicosídeos diterpênicos (C_{20}) encontrados em plantas (FONTANA et al., 2000).

Quadro 1- Alguns carotenóides encontrados na natureza

Carotenóide	Fonte
α -caroteno	Cenoura, caraguatá
β -caroteno	Cenoura, caraguatá, manga
Luteína	Gema de ovo
Criptoxantina	Milho amarelo, páprica
Zeaxantina	Gema de ovo, milho
Crocina	Açafrão
Bixina	Urucum
Capsantina	Pimenta vermelha
Capsorubina	Páprica
5,6-monoepoxi- β -caroteno	Caraguatá
5,6-diepoxi- β -caroteno	Caraguatá
Violaxantina	Amor perfeito
Licopeno	Tomate, melancia

Fonte: BOBBIO e BOBBIO, 1992a

A característica que dá aos carotenóides suas propriedades e funções distintas é a presença de um longo sistema cromóforo de ligações duplas conjugadas. Carotenóides, portanto, têm o máximo de absorção de 400-500 nm e são coloridos (BRITTON, 1991). Esta estrutura altamente insaturada torna estes pigmentos sensíveis à luz, oxigênio e ao calor (CLYDESDALE e FRANCIS, 1976). A maioria dos carotenóides é termolábil, principalmente as xantofilas. A luz solar direta ou luz ultravioleta podem causar a fotoisomerização cis-trans, podendo inclusive, em condições mais enérgicas, causar a destruição desses pigmentos (BOBBIO e BOBBIO, 1992a).

Os carotenóides com uso permitido no Brasil são o alfa, beta e gama-caroteno, bixina, norbixina, capsantina, capsorubina e licopeno (GHIRALDINI, 1991).

2.4.1 – Biossíntese de carotenóides

Os carotenóides são unidades isoprenóides e são biossintetizados a partir de acetil coenzima A, via ácido mevalônico. Os estágios iniciais são comuns à biossíntese de todos os compostos isoprenóides. O primeiro passo, que é específico para carotenóides, é a formação do fitoeno a partir de duas moléculas de geranylgeranyl difosfato (GGDP) (MANN, 1995). A partir desta etapa, iniciam-se aquelas relacionadas exclusivamente com a biossíntese de carotenóides: dessaturação, ciclização, hidrogenação, etc (BRITTON, 1992).

Os carotenóides são biossintetizados em plantas superiores, algas, fungos e bactérias. Os animais não são capazes de realizar biossíntese, embora muitos deles sejam capazes de metabolizar e modificar estruturalmente alguns carotenóides ingeridos (BRITTON, 1992).

2.4.2 – Absorção dos carotenóides

Existem evidências de que vários fatores, como estilo de vida e características pessoais, também se correlacionam com os níveis sanguíneos, sugerindo possível influência na absorção e, ou, no metabolismo dos

carotenóides (CARVALHO, 2000). O tabagismo, consumo de álcool, índice de massa corporal, distribuição de gordura corporal e o colesterol sanguíneo podem ser citados como características determinantes na concentração de carotenóides no corpo humano (BRADY et al., 1996).

Os carotenóides não têm um mecanismo específico para a absorção, transporte intracelular ou incorporação em lipoproteínas pelos enterócitos. Entretanto, em mamíferos, o mecanismo específico é diferenciado de acordo com a habilidade para absorver carotenóides intactos no intestino delgado e então subdivididos de acordo com a habilidade para acumular hidrocarbonetos de carotenos ou para acumular indiscriminadamente carotenos e oxicarotenos no sangue e tecidos. As espécies que absorvem carotenóides seletivamente sugerem a evolução de vias de absorção intestinal que são seletivas para carotenóides e oxicarotenóides. Os humanos são os únicos que absorvem indiscriminadamente carotenos e oxicarotenos no intestino delgado (WHITE e PAETAU, 1998).

Humanos geralmente absorvem bem todos os carotenóides oferecidos pela dieta. Muitos outros mamíferos como rato, gato e carneiro são pobres absorvedores e metabolizadores. Os carotenóides ingeridos por meio da dieta são absorvidos ao longo do intestino juntamente com outros lipídios (BAUERNFEIND, 1989).

A absorção dos carotenóides é um processo influenciado por vários fatores, por exemplo, variação nas propriedades físico-químicas associadas aos carotenóides, alteração na utilização dos carotenóides como resultado da absorção e transporte de lipídios, divergência no destino metabólico dentro dos enterócitos, diferenças no transporte nas lipoproteínas e a possível isomerização de carotenóides nos tecidos (FURR e CLARK, 1997). A forma física na qual o carotenóide é apresentado às células da mucosa intestinal é de crucial importância (OLSON, 1994).

Os sais biliares têm um importante papel na absorção de carotenóides e na subsequente clivagem a vitamina A. Além dos sais biliares, o pH intraluminal e presença de lipídios dietéticos são importantes fatores determinantes da absorção dos carotenóides (FURR e CLARK, 1997).

Pouco é conhecido sobre a solubilização micelar de carotenóides no lúmen intestinal como um veículo para a absorção pelas células epiteliais do intestino. Existe maior transferência espontânea de oxicarotenóides polares, tais como a luteína e zeaxantina, da emulsão dietética para as micelas e uma potencial diferença na solubilização micelar desses carotenóides e carotenóides hidrocarbonados (WHITE e PAETAU, 1998).

O mecanismo de transporte intracelular de carotenóides é desconhecido. As proteínas citoplasmáticas que se ligam ao retinol, CRBP e CRBP II, têm uma importante função no transporte e metabolismo dos retinóides. O produto desta reação, retinol ligado ao CRBP II, é subsequente esterificado pela aciltransferase lecitina-retinol e incorporado nos quilomícrons (ONG, 1993).

Dos carotenóides ingeridos, cerca de 50 a 90% são excretados diretamente. Os carotenóides restantes se incorporam em micelas lipídicas junto com outros compostos lipofílicos e são absorvidos pela mucosa intestinal. Os quilomícrons são responsáveis pelo transporte posterior dos carotenóides ao sistema linfático. Após sua liberação para a corrente sangüínea, os quilomícrons são processados em resíduos de quilomícrons, que são captados principalmente pelo fígado. Os carotenóides internalizados são utilizados para produzir retinóides ou para fazer parte da estrutura da VLDL, que serão transformadas em LDL, sendo esta a principal forma de transporte dos carotenóides no sangue. Os carotenóides sofrem uma interconversão de isômeros trans-cis como resultado de processos fotoquímicos ou térmicos (RODRIGUEZ-AMAYA, 1985 e 1989).

Pode ocorrer interação entre o β -caroteno e a cantaxantina e luteína, que são oxicarotenóides, durante a absorção intestinal. Este é um fato importante porque a suplementação de β -caroteno tem um efeito significativo sobre a concentração sangüínea ou sobre o metabolismo de oxicarotenóides (WHITE e PAETAU, 1998).

Além do plasma, os carotenóides são encontrados em outros tecidos como a glândula adrenal, corpo lúteo, fígado e tecido adiposo. Têm sido identificados também na retina e na glândula pineal (OLSON, 1994).

2.4.3 – Efeitos farmacológicos dos carotenóides

Tem-se identificado uma gama de variedades de compostos biologicamente diferentes e que são importantes micronutrientes que contribuem para o aporte de vitamina A nos humanos, e alguns carotenóides estruturalmente adequados se metabolizam a retinal ou retinol in vivo (BRITTON, 1992).

O α -caroteno possui 50 a 54% de atividade de vitamina A, β -caroteno possui 100% de atividade, δ -caroteno possui 42 a 50% e β -apo-8'-carotenal, 72% (TAYLOR, 1992). Entretanto, a importância nutricional de outros carotenóides na prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e doenças degenerativas relacionadas à idade, tal como a degeneração macular senil (DMS) têm sido estudadas (KHACHIK, et al., 1998, BENDICH, 1994). Segundo GOUD et al. (1993) os carotenóides têm atividade antioxidante, antiartrítica, anti-hepatotóxica, antiinflamatória e hipocolesterolêmica. Para atuar como precursor de vitamina A, um carotenóide deve ser dotado de pelo menos um anel β -ionona não substituído com cadeia lateral poliênica de pelo menos 11 carbonos (RODRIGUEZ-AMAYA, 1985 e 1989).

Estudos realizados com seres humanos e animais sugerem que a vitamina A influencia a utilização do ferro (SOMMER, 1988).

A importância desses carotenóides que não podem ser convertidos a vitamina A tem sido obtida de vários estudos interdisciplinares, que podem ser classificados como: (a) estudos epidemiológicos, (b) distribuição de carotenóides em frutas, vegetais, soro humano e leite, (C) carotenóides nos órgãos e tecidos humanos, (d) estudos in vitro e (e) recentes estudos in vivo com roedores (KHACHIK et al., 1998).

Estudos epidemiológicos têm proporcionado provas de que um consumo maior de uma dieta rica em carotenóides reduz a incidência de vários tipos de câncer (RODRIGUEZ-AMAYA, 1985 e 1989). Baixos níveis de β -caroteno sérico ou plasmático estão consistentemente associados com o subsequente desenvolvimento de câncer intestinal (ZIEGLER, 1988). Porém, o mecanismo

bioquímico relacionado a estes efeitos benéficos para a saúde não está completamente elucidado (RODRIGUEZ-AMAYA, 1985 e 1989).

Um possível mecanismo para uma associação positiva entre ingestão dietética de frutas e vegetais ricos em carotenóides e a diminuição da incidência de certos tipos de câncer pode ser o aumento da resposta imune estimulada pelos carotenóides (BAKER e MEYDANI, 1993).

Tanto o β -caroteno quanto a cantaxantina têm demonstrado efeito protetor contra o aparecimento de câncer de pele induzido por raios ultravioleta. Similar observação tem sido feita em culturas de células e tecidos onde carotenóides têm demonstrado prevenir a transformação maligna e danos nucleares. Entretanto, o mecanismo de proteção ainda não foi totalmente elucidado, existindo evidências de que os carotenóides podem possuir ação quimioprotetora com respeito à formação de tumor (KRINSKY, 1988 e 1994).

A transformação de fibroblastos pelos carcinógenos é inibida pelos retinóides e carotenóides, e seu potencial inibidor está correlacionado com sua capacidade para induzir a comunicação entre as junções "GAP". As junções "GAP" são canais transmembranas que permitem a difusão de moléculas entre células conectadas (STAHL e SIES, 1996).

Os eventos que ocorrem durante o desenvolvimento do câncer envolvem a formação e ativação de carcinógenos, indução de danos genéticos, estimulação de proliferação celular e interrupção da regulação do crescimento e diferenciação celular normal. Devido às propriedades antioxidantes dos carotenóides, estes podem prevenir danos genéticos por eliminar espécies reativas e proteger o DNA de um dano oxidativo (BIDLACK et al., 1998).

Estudos *in vitro* e com animais de laboratório sugerem que o β -caroteno pode proteger as células fagocitárias dos danos autoxidativos, aumentar as respostas proliferativas dos linfócitos T e B, estimular a função celular do efetor T, aumentar o número de macrófagos, aumentar a capacidade citotóxica da célula T e sua capacidade de eliminar células tumorais, bem como aumentar a produção de certas interleucinas. Muitos desses efeitos também podem ser observados em carotenóides que não têm atividade pró-vitamina A, mas que têm capacidade de eliminar o oxigênio simpleto (BENDICH, 1988).

A curcumina inibe o crescimento de uma grande variedade de células tumorais, mas, as células normais parecem ser relativamente resistentes. O efeito supressor da curcumina nas células tumorais é devido à inibição da proteína quinase, que é a enzima regulatória envolvida no metabolismo de glicogênio, e é possível que a inibição desta enzima possa bloquear a ação autócrina de fatores de crescimento necessários para a proliferação celular (REDDY e AGGARWAL, 1994).

Segundo SREEJAYAN e RAO (1997), a curcumina tem capacidade de eliminar óxido nítrico, que é um radical livre sintetizado por macrófagos ativados, e está implicado na inflamação, câncer e outras condições patológicas.

O licopeno, um carotenóide encontrado principalmente em tomates, tem atividade antioxidante, induz a comunicação entre as células e controla o crescimento celular. Estudos sugerem que ele tem efeito protetor de alguns tipos de câncer, como exemplo, o de próstata (STAHL e SIES, 1996).

As propriedades fotoprotetoras e antioxidantes da molécula de carotenóide intactas são bem estabelecidas, entretanto, o mecanismo de ação necessita ainda ser completamente descrito (MATHEUS-ROTH, 1991).

A teoria atual é que doenças crônicas tais como as cardiovasculares e câncer podem ser iniciadas e propagadas pela ação de espécies de oxigênio excitado (radical superóxido, radical hidroxil, peróxido de hidrogênio ou oxigênio simpleto) que ataca as membranas lipídicas das células causando danos oxidativos e tornando as células mais susceptíveis a agentes tóxicos e carcinogênicos (RUXTON, 1994).

Os carotenóides fornecem proteção contra problemas oculares diversos, como a DMS (CARVALHO, 2000). Os carotenóides que estão concentrados no centro da retina, onde a exposição à luz é mais intensa, podem protegê-la contra os danos fotooxidativos, devido à habilidade de absorver e dissipar energia radiante e de eliminar radicais livres ou espécies reativas de oxigênio, agindo assim como antioxidante (PALOZZA e KRINSKI, 1992).

O oxigênio simpleto é produzido nas reações de intercâmbio de energia quando um sensibilizador é excitado pela luz e subsequentemente transfere

sua energia ao oxigênio em estado fundamental (RODRIGUEZ-AMAYA, 1985 e 1989).

A desativação do oxigênio singleto pelos carotenóides é produzida principalmente por uma eliminação física. Este processo implica na transferência de energia de excitação do oxigênio singleto ao oxigênio em estado fundamental, produzindo a formação de oxigênio em estado fundamental e um carotenóide tripleto. A energia do carotenóide excitado se dissipa através das interações entre o carotenóide e o solvente que o rodeia para recuperação do carotenóide e produção de energia térmica. O carotenóide permanece intacto através do processo de eliminação física e pode ser introduzido em outro ciclo de desativação (RODRIGUEZ-AMAYA, 1985 e 1989).

A desativação dos radicais peróxidos pelos carotenóides também implica em uma reação química entre o radical e o carotenóide. O carotenóide é modificado quimicamente nesta interação, e os produtos resultantes são antioxidantes menos ativos. O processo de eliminação de radicais peróxidos pelos carotenóides depende da tensão de oxigênio no sistema (RODRIGUEZ-AMAYA, 1985 e 1989).

Os carotenóides são eficientes antioxidantes contra o oxigênio singleto, sensibilizadores fotoquímicos tripleto e os radicais peróxido, contribuindo deste modo para o sistema de defesa do organismo (BURTON, 1988). Os antioxidantes inibem a autooxidação dos lipídios seqüestrando os radicais peróxidos. O antioxidante transfere um átomo de hidrogênio do radical peróxido (WONG, 1989).

Como os carotenóides têm ação antioxidante, é possível que eles funcionem em parte para proteger a lipoproteína de baixa densidade (LDL) de oxidação. Tal proteção pode ser importante no desenvolvimento da aterosclerose que é uma doença que pode estar relacionada com a oxidação do LDL (ROMANCHIK et al., 1997, KOHLMEIER e HASTING, 1995).

Os conhecimentos sobre a importância das modificações das lipoproteínas (oxidação) na lesão endotelial e na patogênese da aterosclerose renovaram o interesse pelos agentes antioxidantes. Os carotenóides atuam

como antioxidantes lipossolúveis, além de interagirem com radicais livres e seqüestrarem diversas espécies de radicais que podem ser geradas dentro das células (BATLOUNI e RAMIRES, 1994).

REDDY e LOKESH (1996) em um estudo sobre o efeito da curcumina e do eugenol sobre os danos hepáticos induzidos através de injeção de 30 mg de Fe^{2+} em solução salina, demonstraram que as substâncias reduziram tais danos pela diminuição da peroxidação dos lipídios, verificado pela redução dos níveis de AST e ALT.

VALENTE (1998) estudou o efeito de diversos corantes naturais, entre eles a cúrcuma, que é um carotenóide, sobre os níveis de colesterol e triacilgliceróis sanguíneos, em ratos hipercolesterolêmicos. Houve redução dos níveis nos parâmetros estudados.

BABU e SRINIVASAN (1997), em um estudo com ratos alimentados com curcumina, observaram uma redução nos níveis hepáticos e séricos de colesterol, triacilgliceróis e fosfolipídios e relacionaram tal fato com o aumento na atividade da enzima colesterol-7- α -hidroxilase, enzima chave na conversão de colesterol a ácidos biliares.

Carotenóides podem aumentar a concentração da lipoproteína de alta densidade (HDL) (BENDICH, 1994) e com isso reduzir os níveis de colesterol total, já que o HDL retira o colesterol da corrente sangüínea e o leva ao fígado para que possa ser metabolizado.

O efeito hipolipidêmico de carotenóides pode estar relacionado à ação da lipase lipoprotéica que pode ser ativada pela bixina (LIMA, 2001). O mecanismo de ação para explicar tal fato é a formação de quelatos entre a enzima e esses compostos. Esses quelatos induzem a mudança conformacional da enzima, modificando seu centro ativo (MOULIN et al., 1994).

Segundo HASMEDA e POLYA (1995), a cúrcuma estimula a conversão da adenosina monofosfato (AMP) a adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O AMPc atua estimulando a proteína quinase, que por sua vez, atua ativando a lipase inativa, ativando-as. Essas enzimas agem hidrolisando os triacilgliceróis.

Usando um sistema de células, foi descoberto que os carotenóides podem eliminar os ânions superóxidos pelo sistema xantina/xantina oxidase.

Sua habilidade para eliminar ânions superóxidos diminuiu nessa ordem decrescente: cantaxantina, bixina, luteína, beta-caroteno (ZHAO et al., 1998).

UNNIKRISHNAN e RAO (1992) relataram os efeitos de curcumina como antiinflamatórios inibindo a formação de prostaglandinas e leucotrienos. Este mecanismo é interessante, uma vez que, estas substâncias inibem as enzimas ciclooxigenases e lipoxigenases, que são responsáveis pela formação destas substâncias em processos inflamatórios que ocorrem na aterosclerose.

O efeito antiinflamatório de curcuminato de sódio foi observado em um experimento com indução de inflamação por carragenina e formalina em ratos (SAMBALIAH et al., 1982).

Em um experimento, quatro tortas forrageiras, torta de urucum e azeite de palma africana foram administrados a ratos com depleção de vitamina A. A porcentagem de absorção de carotenóides das tortas forrageiras desidratadas foi a seguinte: desmodium (*Desmodium intortum*), 57; pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), 77; ramio (*Boehmeria nivea*), 41. A porcentagem de absorção das sementes de urucum (*Bixa orellana*) foi de 44 e azeite de palma africana (*Elaeis guineensis*), 65. A porcentagem de riboflavina absorvida dos diversos alimentos foi: de desmodium, 77; pasto kikuyo, 84; ramio, 80; urucum, 69; azeite de palma africana, 68. Apesar das diferenças na absorção dos carotenóides e riboflavina dos diferentes alimentos, não houve diferenças significativas quanto aos valores do soro de riboflavina ou de vitamina A. Os carotenóides do urucum foram bem absorvidos. O alto conteúdo de caroteno no soro indica que nem todos os carotenóides, medidos quimicamente, têm atividade de vitamina A. Aparentemente os ratos não convertem alguns carotenóides em vitamina A ou algum fator no urucum interfere nessa conversão (SQUIBB et al. 1953).

Muitas pesquisas têm demonstrado o efeito positivo de carotenóide dietético ou suplementado no aumento da fertilidade ou capacidade reprodutiva em animais, mas, ainda se necessita de mais pesquisas para que se possa elucidar completamente este efeito (KRINSKY, 1994 e BRITTON, 1996).

2.5 - URUCUM

Planta da família Bixaceae, oriunda do leste dos Andes, América do Sul, Índia, Oeste da África e Filipinas (LAURO, 1995), atinge até 4 metros de altura, tem folhas codiformes, pontudas e dentadas, flores grandes hermafroditas de cor azul, com cinco sépalas nas extremidades dos galhos, formando fascículo; deles nascem cápsulas ovóides, com dois carpelos cobertos de espinhos flexíveis contendo cada um 30 a 40 sementes cobertas de uma polpa mole, tenaz, vermelha. As cápsulas podem se apresentar de coloração vermelha ou esverdeada (OHASHI et al., 1982).

Extratos de urucum são produtos oleosos ou alcalinos obtidos por remoção da camada externa das sementes da árvore do urucum (*Bixa orellana* L.) (TAKAHASHI, 1989).

O pigmento do urucum é conhecido há muito tempo, tendo sido utilizado pelos índios sul-americanos na coloração de seus corpos, artesanatos e instrumentos de caça e pesca e como repelente de insetos. Atualmente observa-se a aplicação deste corante, como corante ou condimento doméstico e até sua aplicação industrial em alimentos, fármacos e cosméticos (CARVALHO, 1989).

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

Segundo GHIRALDINI (1994), do urucum são produzidos: corantes hidrossolúveis à base de norbixina; corantes lipossolúveis à base de bixina; condimentos como colorau ou colorífico, muito comum na culinária brasileira e na América Latina.

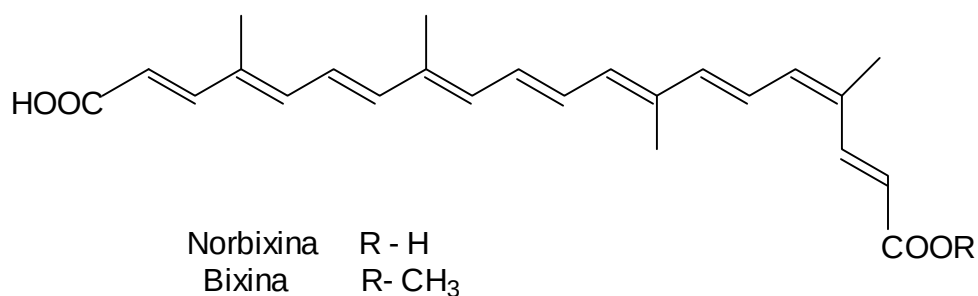


Figura 2 – Estruturas químicas da bixina e da norbixina

A metodologia de extração da bixina segundo a CHR. Hansen está demonstrada a seguir:

- Pesar 25g de sementes em um béquer de 1000 mL. Adicionar 150 mL de solução de sabão,
- Determinar o peso total do béquer mais a solução de sabão,
- Aquecer a solução até a ebulição e manter nesse estado por 1 minuto,
- Depois de ebulir por 1 minuto, deixe esfriar. pese novamente o béquer e complete para o peso obtido no item 2 com água destilada,
- Adicionar 350 mL de água destilada,
- Pipetar 1 mL da solução e limpar a parte externa da pipeta com papel absorvente até ficar bem limpa,
- Ajustar a amostra no menisco da pipeta,
- Transferir a amostra para um balão de 1000 mL e completar o volume com solução lye 0,1%,
- Enxaguar a pipeta com solução lye 0,1%, colocando a solução no balão,
- Colocar nova solução lye 0,1% em um béquer de 100 mL e encher de 1 mL. Esvaziar a pipeta dentro do balão. Repetir esse passo várias vezes até estar seguro que a amostra foi retirada completamente das pipetas,
- Completar o volume do balão até a marca graduada com solução lye 0,1%, agitando e invertendo várias vezes para garantir uma mistura homogênea,
- Zerar o espectrofotômetro usando água destilada como branco,

- Determinar a densidade óptica (DO) lendo a amostra em 480nm com máxima variação de 5 nm

A DO é multiplicada pelo fator (6,97), dando o resultado em % de bixina.

O corante é empregado em condimentos (colorau ou colorífico), maioneses, margarinas, molhos para saladas, sorvetes, balas, produtos de confeitaria, pós instantâneos para sobremesa, aperitivos e na indústria de laticínios (iogurte, manteiga, queijo) (GUIMARÃES, 1994).

Devido à característica do pigmento de urucum, de ser lipossolúvel e se tornar hidrossolúvel na presença de álcali, é o corante natural mais usado na indústria de alimentos (GHIRALDINI, 1996), como visto no Quadro 2.

Quadro 2 – Uso dos pigmentos do urucum em alimentos

Extrato	Forma	Pigmento	Concentração	Tonalidade da cor	Aplicações
Lipossolúvel	Líquido	Bixina	Baixa	Amarelo	Massas, recheios e coberturas de doces e molhos
	Líquido	Bixina	Baixa	Amarelo-alaranjado	Margarina, cremes vegetais, queijos, recheios e coberturas de doces e molhos
	Líquido	Bixina	Alta	Laranja-avermelhado	Sopas, molhos, temperos e coloríficos
Solúveis em água e emulsões	Líquido	Norbixina	Baixa	Amarelo-alaranjado	Massas, sorvetes, bebidas, iogurtes e queijos
	Líquido	Norbixina	Moderada	Laranja	Margarina, cremes vegetais, queijos, bebidas, iogurtes e sorvetes
	Líquido	Norbixina	Baixa	Amarelo claro	Massas, sorvetes, bebidas, iogurtes e doces
Hidrossolúvel	Líquido	Norbixina	Moderada	Laranja-amarelado	Salsichas, embutidos, cereais, biscoitos e queijos
	Líquido	Norbixina	Alta	Laranja	Iogurtes, sorvetes, bebidas, doces, misturas para bolos
	Pó	Norbixina	Alta	Laranja	Massas, sopas, temperos, sorvetes e cereais
Colorífico	Pó	Bixina	Baixa	Laranja	Uso doméstico
	Pó	Bixina	Moderada	Laranja-avermelhado	Temperos e sopas

*Baixa: 0,1 a 0,5%; moderada: 0,6 a 2,4% e alta: 2,5 a 6,0%

Fonte: KATO et al., 1998

A maioria das interações dos pigmentos do urucum ocorre com as proteínas, como as interações iônicas e as pontes de hidrogênio.

Os produtos lácteos são a mais importante aplicação de extratos de urucum. Queijos, particularmente Red Leicester, Cheshire, Cheddar e Americano, têm sido tradicionalmente coloridos com solução de norbixina (HENDRY, 1996; FREUND e WASHAM, 1988).

O sal de norbixina tem a capacidade de formar complexos estáveis com a caseína (COLLINS, 1992). Tal ligação estabiliza o corante, evitando a sua migração através do produto (ARAÚJO, 1999).

Apesar do sal de norbixina formar complexos com a caseína, evitando sua migração para o meio e protegendo-o da degradação, em bebidas lácteas fermentadas, o mesmo não se mantém disperso homogeneamente, depositando-se na parte inferior do recipiente (CONSTANT, 1999).

O norbixinato de cálcio é pouco solúvel em água e diante disso, extratos contendo norbixinato não devem ser usados em produtos com altos níveis de cálcio. Então, não é recomendado usar “água dura” para fazer a diluição do corante para corar queijos (HENDRY, 1996).

A norbixina tem a característica de se manter solúvel em água somente quando o pH alcalino é mantido. Devido a isso em muitos alimentos que não possuem este pH, quando a norbixina é adicionada, é rapidamente absorvida pela proteína e/ou componentes do amido do alimento e conseqüentemente, torna-se insolúvel. Isso resulta em um produto colorido uniformemente e não perderá a cor. Esta característica é extremamente valiosa para que a substância possa ser usada em produtos como os cereais matinais, pois, assim a cor não é perdida para o leite adicionado pelo consumidor (FREUND, 1985).

A norbixina é ideal para colorir produtos de confeitaria, pois se liga à farinha e forma uma cor estável que não é perdida (HENDRY, 1996). Provavelmente a ligação seja entre o pigmento e a proteína do trigo.

A presença de alguns tipos de bactérias em carnes, leva à descoloração dos pigmentos, devido ao acúmulo de peróxido de hidrogênio procedente da oxidação bacteriana de substratos desconhecidos nas carnes expostas ao oxigênio (PRICE e SCHWEIGERT, 1994).

No caso dos peixes, a norbixina se liga à proteína e não há perdas significativas de corantes durante os subseqüentes processamentos e o cozimento final feito pelo consumidor (HENDRY, 1996).

Uma importante interação pode ocorrer entre o pigmento e compostos que contenham grupos carboxílicos, particularmente hidrocolóides. Uma vez que os hidrocolóides são polímeros de alto peso molecular, sua estrutura confere proteção ao pigmento em relação a fatores destrutivos em potencial (CONSTANT, 1999).

Gomas, estabilizantes e emulsificantes são ingredientes necessários para que a bixina se torne miscível em água. É importante que esses ingredientes sejam compatíveis com o sistema alimentar que será colorido (HENDRY, 1996).

Por causa da estrutura de duplas ligações, todo carotenóide é susceptível à oxidação. A adição de ácido ascórbico como um seqüestrador de oxigênio é benéfico (HENDRY, 1996).

O dióxido de enxofre é um dos mais versáteis preservativos para alimentos, tendo valor também como protetor do ácido ascórbico, carotenóides e outros compostos facilmente oxidáveis (GAVA, 1988). Entretanto, segundo HENDRY (1996), a intensidade da cor pode ser reduzida na presença de dióxido de enxofre, então, sistemas de conservação alternativos são recomendados quando se usa pigmentos do urucum como corante.

Dificuldades podem surgir quando o meio é ácido, o que é o mais comum em sistemas alimentícios, onde o carboxilato é reprotonado, formando o ácido dicarboxílico insolúvel em água, precipitando o pigmento. Para prevenir isto, um emulsificante pode ser usado e, dependendo do emulsificante e do método de produção, um extrato hidrossolúvel mais estável pode ser formado, mesmo em pH em torno de 2 (CONSTANT, 1999).

Nos alimentos processados o mecanismo de oxidação é complexo e depende de muitos fatores; os pigmentos podem autooxidar por reação com o oxigênio atmosférico a velocidades que dependem da presença de luz, calor e de pró e antioxidantes. Os carotenóides sofrem a oxidação acoplada em presença de lipídios a velocidades que dependem do sistema. Os carotenóides são mais estáveis em sistemas com alto grau de insaturação, possivelmente porque o sistema lipídico por si mesmo aceita os radicais livres mais facilmente

que o pigmento. Ao contrário, os carotenóides são menos estáveis em sistemas lipídicos com baixo grau de insaturação (FENNEMA, 1993).

Essa oxidação dos carotenóides altera a cor, podendo até elimina-la, e é mais intensa em alimentos liofilizados, nos quais a camada protetora de absorção primária de água foi eliminada ou reduzida e a porosidade é muito grande (BOBBIO e BOBBIO, 1992b).

A norbixina pode ser usada em bebida de frutas ácidas, porém, a bebida deve conter a polpa de fruta finamente dispersa, para que o pigmento se ligue, resultando em um material colorido (FREUND e WASHAM, 1988).

Além das interações com os ingredientes e/ou nutrientes do alimento, devemos nos preocupar também com o tipo de embalagem usada para alimentos coloridos com os pigmentos do urucum, pois, o teor de bixina é fortemente influenciado pela incidência de luz e em menor grau pela presença de oxigênio (NAJAR et al., 1988). Os antioxidantes são muito eficientes no retardo da transformação induzida pela luz (NAJAR et al., 1988).

2.5.1 – Propriedades toxicológicas e farmacológicas do urucum

O urucum pode ser usado como fármaco, como visto no quadro abaixo.

Quadro 3 – Usos do urucum em diversos países

Países	Usos
Brasil	Excitante, azia, estomacal, diurético
Haiti	Repelente de insetos, febre
Hawai	Depurativo, fraqueza, estomatite
México	Cefaléia, antídoto contra o ácido prússico, queimadura, diurético, disenteria, febre, gonorréia, inflamação
Trinidad	Gripe, disenteria, oligúria
Outros	Licor, cosméticos, diabetes, febre

Fonte: SCHULTES, 1990

Foram feitas investigações científicas a respeito da toxicidade do urucum durante 30 anos. Repetidas administrações orais não demonstraram efeitos tóxicos em ratos, macacos, cachorros ou porcos e neste estudo a substância não apresentou efeito tóxico sobre a reprodução em multigerções de ratos. Nenhuma evidência de carcinogenicidade foi estabelecida. Danos nas células mamárias foram verificados somente quando havia uma exposição a altas concentrações. A ingestão diária aceitável para humanos, estabelecida pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), foi de 0,065 mg/Kg/dia de bixina (ENGELHARDT et al., 1988).

Estudos toxicológicos de mutagenicidade e toxicidade aguda, realizados em 1964, 1969 e 1974 pela FAO/WHO para definir a IDA (ingestão diária aceitável), demonstra em seus resultados que o corante de urucum numa concentração de 0,5g/100 ml nas culturas de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* e DL₅₀ a uma concentração de 21mg/kg em ratos, não induziu genotoxicidade detectável, sendo ainda observados nestes testes que doses a uma concentração de 1mg/ mL exibe propriedades antiespasmódicas e hipotensivas. Neste mesmo trabalho foram realizados estudos de curto e longo prazo, utilizando ratos, camundongos, cachorros, porcos e homem, não apresentando formação de tumores, nem alterações nos exames hematológicos, histopatológicos, renais, peso das vísceras, crescimento e reprodução, ficando ainda claro que o mesmo não se acumulava nos tecidos.

Em investigações sobre a toxicidade do urucum, realizados na Holanda, com experiências em ratos, camundongos e suínos, concluiu-se que o pigmento não apresentou toxicidade, podendo ser empregado com segurança para colorir manteigas, margarinas e queijos (SPOON, 1960).

Em um estudo realizado com alguns corantes naturais, incluindo o urucum, foram determinados os níveis de alguns minerais, concluindo-se que os corantes não são boas fontes de minerais e também não oferecem risco à saúde por não conter excesso dos mesmos. O urucum não apresentou concentração de metais pesados acima dos níveis permitidos pela legislação brasileira (OLIVEIRA et al., 1997).

O extrato de sementes de urucum, que é comumente usado no tratamento do diabetes mellitus, foi investigado por este efeito nos níveis séricos de cachorros. Uma fração álcali-solúvel indutora de hiperglicemia foi

detectada, e estudos detalhados revelaram efeitos tóxicos no pâncreas e fígado acompanhado pela hiperglicemia e aparente tendência a aumentar os níveis de insulina. A toxicidade foi diminuída pela ingestão de riboflavina. O dano nos órgãos pode ser devido à susceptibilidade causada pelo baixo estado nutricional (MORRISON et al., 1987).

Em um estudo, o extrato de semente de urucum foi seco e solubilizado em óleo, e uma solução saturada produziu uma hipoglicemia e insulinopenia. Uma solução alcoólica produziu hiperglicemia. Isto sugere que existem dois princípios ativos, um agente solúvel em óleo hipoglicemiante e um álcool solúvel hiperglicemiante (MORRISON e WEST, 1985).

DUNHAM e ALLARD (1960) comprovaram a presença de princípios farmacologicamente ativos nas raízes de *Bixa orellana*. O extrato aquoso tem um pronunciado efeito na atividade motora espontânea em camundongos. O extrato inibe o volume da secreção gástrica sem influenciar a produção de ácidos e possuindo também propriedades antiespasmódicas e hipotensivas.

Com a finalidade de investigar a recomendação popular do uso de urucum em problemas cardiovasculares, LUDUVING (1997) relata que após testes com cães, ratos e coelhos, comprovou-se a eficiência da água do urucum, obtida por maceração das sementes (composta por mais de 80% de bixina como pigmento), na redução significativa dos índices de colesterol. Em testes clínicos, os resultados se confirmaram num tempo de 10 dias de consumo, ao invés de 15 dias previstos inicialmente, pois havia pacientes com níveis de gordura sanguínea abaixo do normal. Diante disso, pode-se concluir que esse pigmento tenha o poder de acelerar o metabolismo das gorduras, sendo o responsável pela redução das taxas de triacilgliceróis e colesterol.

HAVELAND-SMITH (1981) investigaram a genotoxicidade de 5 corantes naturais (urucum, antocianina, vermelho de beterraba, β -caroteno e riboflavina) permitidos pela Comunidade Econômica Européia. Neste estudo a potencialidade destes corantes para induzir danos no DNA foi investigada através de um ensaio com *E. coli*. Nenhum dos corantes induziu genotoxicidade detectável.

Em um estudo usando extrato de urucum foram avaliadas respostas tóxicas na pele de coelho de uma única aplicação, após repetidas aplicações e após exposição a luz ultravioleta. Estudos histológicos foram conduzidos para

avaliar possíveis danos e penetração do corante na pele do coelho. O estudo mostrou que o corante tem boa tolerabilidade cutânea, podendo ser usado na comestologia (GERMANO et al., 1997).

Um paciente desenvolveu urticária e severa hipotensão em 20 minutos após a ingestão de leite e cereal Fiber OneTM, que continha urucum. Foram feitos testes de pele para leite, trigo e milho e estes foram negativos. O paciente desenvolveu uma forte resposta positiva no teste de pele para urucum. Foi concluído que o urucum contém um contaminante ou uma proteína residual da qual o paciente desenvolveu hipersensibilidade (NISH et al., 1991).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório Biofármacos do Departamento de Bioquímica e no Laboratório de Pigmentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Caracterização do extrato

A substância utilizada no teste toxicológico foi caracterizada através da determinação do ponto de fusão com a utilização do equipamento da marca Quimis, solubilidade (AOAC, 1998), proteína pelo método semi micro Kjeldhal (SILVA, 1990), umidade (SILVA, 1990), cinzas (SILVA, 1990), extrato etéreo (SILVA, 1990), pH (AOAC, 1998), teor de tanino e quantificação do teor de bixina do extrato após 12 meses de estocagem sob refrigeração (4⁰ C).

3.2. Primeiro ensaio biológico – Toxicologia Crônica

O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, com quatro doses de extrato em pó contendo 28% de bixina, em 24 repetições. O extrato foi conservado em recipiente escuro e sob refrigeração.

As doses usadas foram baseadas no estudo de DURHAN e ALLARD (1960), que utilizaram extratos hidrossolúveis intraperitonealmente e estabeleceram a DL_{50} de 700 mg/Kg. Considerando que o peso inicial médio dos animais era próximo de 200g, a DL_{50} seria de 140 mg, sendo a metade desta considerada a menor dose, a maior foi cinco vezes maior que a DL_{50} e a intermediária foi próxima da média das outras duas doses. O grupo 1 recebeu somente ração, grupo 2 recebeu 70 mg de extrato, o grupo 3, 350 mg e o grupo 4 recebeu 700 mg. O extrato foi adquirido no comércio e é o utilizado na indústria de alimentos.

Cada animal foi considerado como uma repetição e avaliada separadamente em machos e fêmeas aos 3 e 6 meses após a aplicação dos tratamentos. O animal utilizado foi o rato (*Rattus norvegicus*), variedade albinus, da raça Wistar, recém-desmamado, com 24 dias de idade.

Os ratos foram colocados em gaiolas individuais, recebendo água “ad libitum” e próximo de 15 gramas de ração, temperatura ambiente variando entre 20 e 24 °C e com iluminação controlada com 12 horas de claro e escuro por um período de cento e oitenta dias. A administração do extrato foi feita diariamente, por via oral, misturada à ração comercial porque com a não ingestão durante 48 horas pode haver recuperação dos efeitos tóxicos.

A ração comercial utilizada era constituída basicamente por: milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, sal e pré-mix.

QUADRO 4 – Composição centesimal da ração comercial

Nutrientes	%
Proteína (min)	23
Extrato etéreo (mín)	2,5
Umidade (máx)	13
Matéria fibrosa (máx)	9,0
Matéria mineral (máx)	8,0
Fósforo (min)	0,8
Cálcio (Max)	1,8

QUADRO 5 – Nutrientes enriquecedores da ração (unidade/Kg de ração)

Nutrientes	Unidade
Vitamina A	20000 UI
Vitamina D ₃	6600 UI
Vitamina E	30 UI
Vitamina K	6 mg
Vitamina B ₁₂	12 mcg
Vitamina B ₂	8 mg
Pantotenato de cálcio	24 mg
Niacina	95 mg
Tiamina	4 mg
Colina	2000 mg
Piridoxina	6 mg
Biotina	0,1 mg
Ácido fólico	0,5 mg
Manganês	50 mg
Iodo	2 mg
Ferro	25 mg
Zinco	35 mg
Cobre	26 mg
Antioxidante	100 mg

Os dados foram submetidos à análise de variância e o efeito do sexo foi testado por meio do teste F ($P < 0,05$), bem como o efeito do tempo de avaliação.

O efeito das doses de bixina foi estudado por meio de análise de regressão. Para escolher o modelo de regressão que melhor descrevia os dados foram considerados o coeficiente de determinação (R^2) e a significância dos coeficientes de regressão, avaliada por meio do teste t de Student ($P < 0,05$).

3.2.1. Avaliação comportamental dos animais

O comportamento dos animais foi monitorado diariamente, quanto à agressividade, sedação, atividade/inatividade. O consumo de água foi verificado diariamente através da frequência de vezes em que o bebedouro, com capacidade de 200mL era cheio, e quanto ao consumo de alimento foi verificado somente se os animais ingeriam todo o alimento que era oferecido para o consumo. Os animais foram pesados no primeiro dia do experimento, no terceiro e sexto mês.

3.2.2. Dosagens dos parâmetros bioquímicos

Após 3 meses e 6 meses do início do experimento os animais foram pesados, sacrificados e foram retiradas amostras de sangue, centrifugadas a 7100 x G por 15 minutos e feitas as dosagens dos níveis séricos de triacilgliceróis, colesterol, proteínas totais, albumina, creatinina, bilirrubina direta, cálcio, fósforo, glicose, Alanina aminotransferase e Aspartato aminotransferase. As dosagens sorológicas foram feitas em equipamento multiparamétrico Bioquímico Alizé, utilizando Kits da marca Biolab.

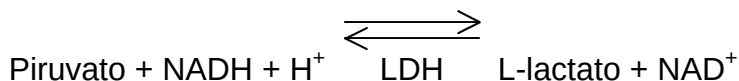
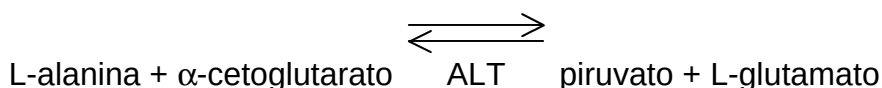
Albumina:

A albumina sérica foi dosada colorimetricamente com verde de bromo cresol como indicador a pH igual a 4,2.

Foi colocado no equipamento uma solução contendo o verde de bromo cresol a 0,14g/L, tampão succinato a 75 mmol/L, Brij 35 a 7ml/L e mertiolate de sódio a 0,01% e separadamente os soros dos animais a serem analisados.

Alanina aminotransferase (ALT):

A determinação cinética da atividade da ALT se baseia na conversão da L-alanina e α -cetoglutarato em piruvato e L-glutamato, mediado por esta enzima. O piruvato formado reage com NADH e o íon hidrônio, produzindo L-lactato e NAD^+ , numa reação catalisada pela malato desidrogenase (LDH) segundo estas reações:

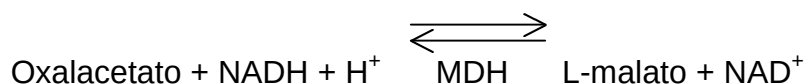


Foi colocada no equipamento uma solução contendo 0,18 mmol/L de NADH, LDH ≥ 1200 U/l, e 15 mmol/L de α -cetoglutarato solubilizados com um tampão contendo 100 mmol/L de tris pH 7,5 com 500 mmol/L de L-alanina e separadamente os soros a serem analisados.

Aspartato aminotransferase (AST):

A determinação cinética da atividade da aspartato aminotransferase se baseia na conversão do ácido aspártico e α -cetoglutarato em oxalacetato e L-glutamato, mediado por esta enzima. O oxalacetato formado reage com NADH e o íon hidrônio, produzindo L-malato e NAD^+ , numa reação catalisada pela malato desidrogenase (MDH) segundo estas reações:





Foi colocada no equipamento uma solução contendo 0,18 mmol/L de NADH, LDH ≥ 1200 U/I, MDH ≥ 500 U/I e 12 mmol/L de α -cetoglutarato solubilizados com um tampão contendo 80 mmol/L de tris pH 7,8 com 200 mmol/L de L-aspartato e separadamente os soros a serem analisados.

Bilirrubina direta:

A dosagem da bilirrubina conjugada direta ocorre segundo uma reação de diazotação com ácido sulfanílico diazotado.

Foi colocado no equipamento ácido nítrico a 17 mmol/L com volume vinte vezes menor que outra solução também colocada no equipamento contendo ácido sulfanílico a 25 mmol/L e ácido clorídrico a 87 mmol/L, e separadamente os soros a serem analisados.

Cálcio:

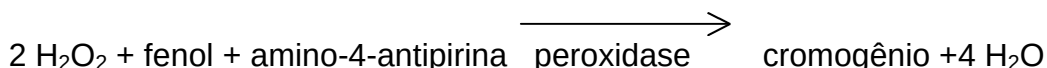
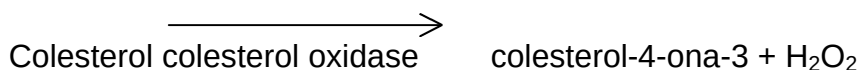
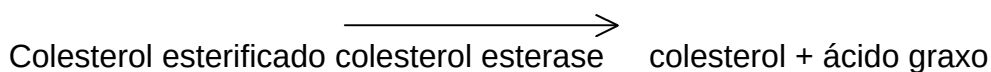
A dosagem colorimétrica do cálcio sérico é feita pelo indicador azul de metiltimol. Esta análise é feita com adição do 8-hidroxiquinoleína para que se possa evitar a interferência dos íons magnésio até uma concentração de 10 mg/dL.

Foi colocada no equipamento separadamente, uma solução alcalina contendo 8-hidroxiquinoleína, outra solução do indicador azul de metiltimol e soros a serem analisados.

Colesterol:

Análise colorimétrica do colesterol baseia-se na transformação do colesterol esterificado em colesterol e ácidos graxos, mediado pela colesterol esterase. O colesterol formado é oxidado pela colesterol oxidase em colesteno-4-on-3, liberando água oxigenada, que juntamente com o fenol e amino-4-

antipirina, pela ação da peroxidase, são transformados em cromogênio (que absorve em 500 nm) e em água, sendo as equações:



Creatinina:

A determinação cinética da creatinina sem a desproteinização consiste em medir o composto formado durante um minuto da reação entre a creatinina e o ácido pícrico, em meio alcalino. O composto formado por esta reação absorve em um comprimento de onda de 492 nm.

Foi colocada no equipamento uma solução alcalina contendo 0,4 mol/L de hidróxido de sódio com 50 mmol/L de fosfato de sódio, misturado com igual volume a uma solução 8,8 mmol/L de ácido pícrico e separadamente os soros a serem analisados.

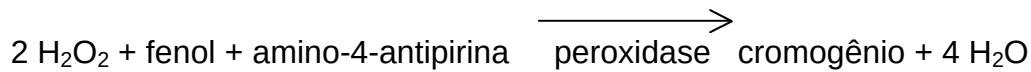
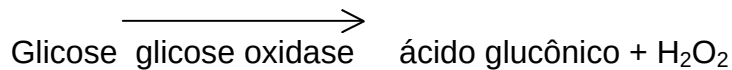
Fósforo:

Os íons fosfato em meio ácido formam com o molibdato amônio um complexo fosfomolibdico cuja absorvância a 340 nm é proporcional à concentração dos íons fosfatos da amostra.

Foi colocada no equipamento uma solução contendo ácido sulfúrico a 200 mmol/L, hepta-molibdato amônio detergente a 0,8 mmol/L e separadamente os soros a serem analisados.

Glicose:

A glicose presente na amostra é dosada segundo o esquema seguinte:



Foi colocada no equipamento uma solução contendo as enzimas hidratadas com a solução tampão e separadamente os soros a serem analisados.

Proteínas totais:

As proteínas totais do soro foram dosadas colorimetricamente pelo método de Biureto, que consiste em complexar a proteína com sais de cobre em meio alcalino, formando um complexo de coordenação entre o íon cúprico e quatro grupos NH das cadeias peptídicas. Este complexo absorve em um comprimento de onda de 545 nm.

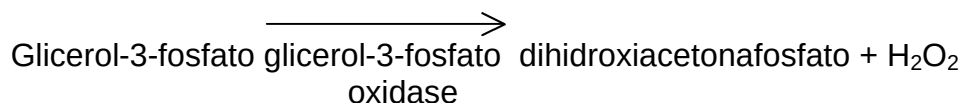
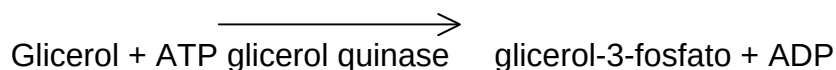
Foi colocada no equipamento uma solução alcalina a 245 mL contendo 0,2 mol/L de hidróxido de sódio, 5 g/L de iodeto de potássio e 9g/L de tartarato de sódio e potássio, misturado com 5 mL de uma solução de 150g/L de sulfato de cobre e separadamente os soros a serem analisados.

Triacilgliceróis:

A dosagem dos triacilgliceróis (TAG) séricos foi feita por via inteiramente enzimática. A lipase degrada os triacilgliceróis em glicerol mais ácidos graxos. O glicerol obtido reage com ATP, em presença da glicerolquinase, obtendo glicerol-3-fosfato e ADP. O glicerol-3-fosfato é oxidado a dihidroxiacetona-fosfato, pela glicerol-3-fosfato oxidase, liberando água oxigenada. A água oxigenada, juntamente com paraclorofenol e amino-4-antipirina, em presença da peroxidase, transforma-se no cromogênio (que absorve em 505 nm), liberando água.

As equações foram as seguintes:

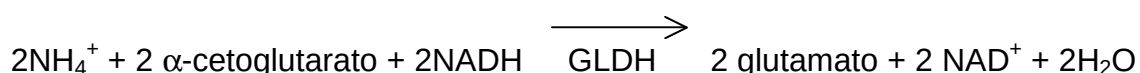
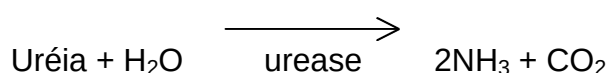




Foi colocada no equipamento uma solução tampão, contendo as respectivas enzimas solubilizadas e separadamente os soros a serem analisados.

Uréia:

Para ser feita a determinação cinética, a uréia em meio aquoso foi transformada em amônia e gás carbônico, pela ação da urease. O íon amônio, por sua vez juntamente com α -cetoglutarato e NADH, em presença da glutamato desidrogenase (GLDH), são convertidos a glutamato, NAD^+ e água, segundo as reações:



Foi colocada no equipamento uma solução contendo 0,29 mmol/L de NADH, GLDH ≥ 1000 U/I, urease ≥ 5000 U/I e 0,4 mmol de ADAP, solubilizados com um tampão contendo 50 mmol/L de Tris pH 8 e 4 mmol/L de α -cetoglutarato e separadamente os soros a serem analisados.

Após estes procedimentos o equipamento foi programado e este promoveu a mistura das soluções mencionadas acima com os soros provenientes das amostras que foram analisados. Os comprimentos de onda utilizados estão demonstrados no Quadro 6.

Quadro 6 – Constituintes dosados e seus respectivos comprimentos de onda

Constituintes	Comprimento de onda (nm)
Albumina	628
Alanina aminotransferase	340
Aspartato aminotransferase	340
Bilirrubina direta	550
Cálcio	612
Colesterol	500
Creatinina	492
Fósforo	340
Glicose	505
Proteínas totais	545
Triacilgliceróis	505
Uréia	340

O aparelho subtraiu a absorvância encontrada no branco (solução tampão das enzimas misturadas com soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente.

3.3. Segundo ensaio biológico – Tolerabilidade Cutânea

Foi feito um teste de tolerabilidade cutânea onde foram utilizados oito coelhos albinos da raça Nova Zelândia (quatro machos e quatro fêmeas), que foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo alimentação (ração comercial) e água *ad libitum*.

Vinte e quatro horas antes da aplicação da bixina, os pêlos da região dorsal do tronco dos animais foram depilados. Foram escolhidos aleatoriamente quatro sítios de aplicação da bixina, dois dos quais foram submetidos à abrasão, com cuidado para que não ferisse a pele do animal.

Uma dose de 0,5 g de extrato contendo 28% de bixina solubilizada em óleo hipoalergênico foi aplicada em dois sítios, um submetido à abrasão e o outro não (Fig 3). Os dois outros sítios serviram de controle da reação. As áreas onde ocorreram as aplicações foram recobertas com gaze fixada com fita hipoalergênica.

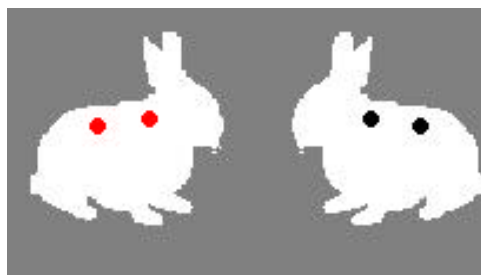


Figura 3 – Representação das áreas corporais utilizadas no experimento, no lado direito do coelho, os pontos em vermelho representam as áreas escarificadas com e sem aplicação do extrato e no lado esquerdo, os pontos em preto representam as áreas não escarificadas com e sem aplicação do extrato.

A duração da exposição foi de quatro horas, depois a região foi limpa.

Após quarenta e oito horas todo o procedimento de aplicação e de lavagem foi repetido, durante 10 dias, totalizando 5 aplicações. A observação dos sintomas de edema, eritema e escaras nos animais foi efetuada após sessenta minutos, 24, 48 e 72 horas após o término da última exposição.

O sistema empregado para a classificação das possíveis lesões foi o empregado pelo Federal Hazardous Substances Act of the USA (BRITO, 1994).

Os irritantes cutâneos são definidos conforme o esquema a seguir:

Formação de eritema e escaras

Lesão	Valor
Sem eritema	0
Eritema leve (apenas perceptível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a grave	3
Eritema grave (vermelho violeta) com escaras	4

Formação de edema

Lesão	Valor
Sem edema	0

Edema leve (apenas perceptível)	1
Edema bem definido (bordas menores que 1 mm).....	2
Edema moderado (bordas de 1 mm)	3
Edema grave (bordas com mais de 1 mm e não restrito às regiões de aplicação)	4

O modelo da tabela que foi utilizado no relatório encontra-se a seguir, assim como o modo de interpretar os resultados nela contidos.

Eritema e escaras	Leitura (H)	Coelhos (nº)						$\bar{X}$
		1	2	3	4	5	6	
Pele íntegra	1							a
	24							b
	48							c
	72							d
Pele escarificada	1							e
	24							f
	48							g
	72							h

Subtotal A = somatória de a até h

Edema	Leitura (H)	Coelhos (nº)						$\bar{X}$
		1	2	3	4	5	6	

Pele íntegra	1							i
	24							j
	48							k
	72							l
Pele escarificada	1							m
	24							n
	48							o
	72							p

Subtotal B = somatória de i até p

Em seguida, os subtotais A e B são somados e o resultado é dividido por quatro (eritema e edema em pele íntegra e escarificada). De acordo com o valor obtido, as substâncias são classificadas em:

0,0 – 1,0 = não irritante

1,1 – 2,0 = irritante moderado

2,1 – 3,0 = irritante grave

3,1 – 4,0 = corrosivo

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do extrato

Os extratos contendo corantes têm sido usados por muito tempo e um dos primeiros a serem usados foi o de urucum. Nesses extratos não há carotenóide puro, ou simplesmente mistura de carotenóides, mas geralmente contêm grande quantidade e variedade de outros componentes não identificados (BRITTON, 1996).

Quadro 7 – Composição do extrato de bixina

	%
Proteína	5,33
Cinzas	2,04
Extrato etéreo	50,49
Tanino	0,009
Umidade	5,49

O ponto de fusão encontrado foi de 180⁰C. Segundo HENDRY (1996) a bixina e a norbixina são estáveis ao calor, entretanto, a degradação de bixina pode ocorrer em temperaturas acima de 100⁰C e o ponto de fusão pode variar de 130 a 220⁰C. O pH foi de 2,62.

O teor de bixina após 12 meses sob refrigeração foi de 20,8%, reduzindo 7,2% do teor inicial. Essa perda pode estar mais relacionada com a exposição à luz, já que não há nenhum relato sobre a instabilidade de extratos contendo bixina a temperaturas baixas e a bixina estava armazenada em saco plástico transparente e este pigmento é instável à luz.

Os resultados do teste de solubilidade estão apresentados no Quadro 8:

Quadro 8 – Solubilidade da bixina em diferentes solventes

SOLVENTE	SOLUBILIDADE
Água deionizada (pH – 7,0)	Não solúvel
Álcool metílico	Parcialmente solúvel
Álcool etílico	Parcialmente solúvel
Éter etílico	Solúvel
Clorofórmio	Solúvel (vermelho tijolo)
Benzeno	Parcialmente solúvel (coloração forte)
Éter de petróleo	Parcialmente solúvel (amarelo claro)
Hexano	Parcialmente solúvel (amarelo claro)

* Solventes da marca Merck, p.a., temperatura ambiente

A ampla solubilidade apresentada pelo extrato, que varia de solventes polares até apolares, pode ser devido ao fato de o extrato conter inúmeras substâncias, o que pode ser comprovado pela diferença na coloração apresentada nos extratos dissolvidos em diferentes solventes. Dentre essas diferentes substâncias presentes no extrato, pode-se encontrar outros carotenóides que foram extraídos do urucum juntamente com a bixina e proteínas que se encontram ligadas aos carotenóides e essas proteínas podem conferir solubilidade aos carotenóides.

4.2. Primeiro ensaio biológico – Toxicologia crônica

Não existe garantia de que toda a bixina ingerida pelos animais na forma de extrato seja absorvida. Segundo O'NEILL e THURNHAM (1997) existem grandes variações entre indivíduos quanto à absorção, entre elas se destacando a diferença entre os sexos. Tal fato é de relevância, pois, neste estudo foram utilizados animais de ambos os sexos.

Em ratos machos, o teor de citocromo P-450, que é um “pool” de enzimas importantes no processo de biotransformação, é, em média, cerca de 40% maior que nas fêmeas. Essa capacidade maior dos machos de biotransformar substâncias lipofílicas, através de enzimas microssômicas, faz

com que reduza a meia-vida biológica dessas substâncias em relação à das fêmeas. Conseqüentemente, os efeitos farmacológicos e toxicológicos também variam entre os machos e as fêmeas (OGA, 1996). Essa diferença de comportamento entre os sexos pode ser comprovada pelos resultados obtidos neste estudo.

4.2.1. Avaliação comportamental dos animais

Através da observação minuciosa e contínua do comportamento dos animais durante os seis meses experimentais pode-se constatar que os animais não tiveram nenhum desvio de comportamento quanto à agressividade, atividade/inatividade e sedação, com exceção de um animal do sexo feminino do grupo 4, ou seja, do grupo que recebeu 700 mg de bixina, que se mostrou apático durante todo o período experimental, mas como se tratava de um caso isolado, não se pode conferir tal reação com a ação da substância estudada.

Quanto ao consumo de alimento, não foi verificada nenhuma diferença visualmente detectável entre os grupos, porém, os farelos restantes, isto é, os que caíam fora do comedouro não foram pesados, não podendo afirmar que não houve alteração entre os grupos.

A frequência de enchimento dos bebedouros está apresentada na Figura 4.

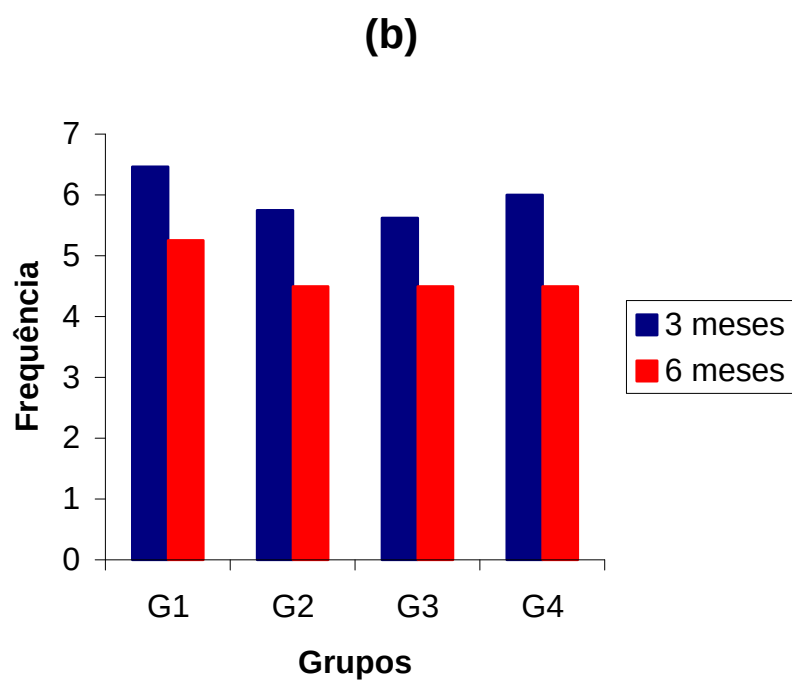
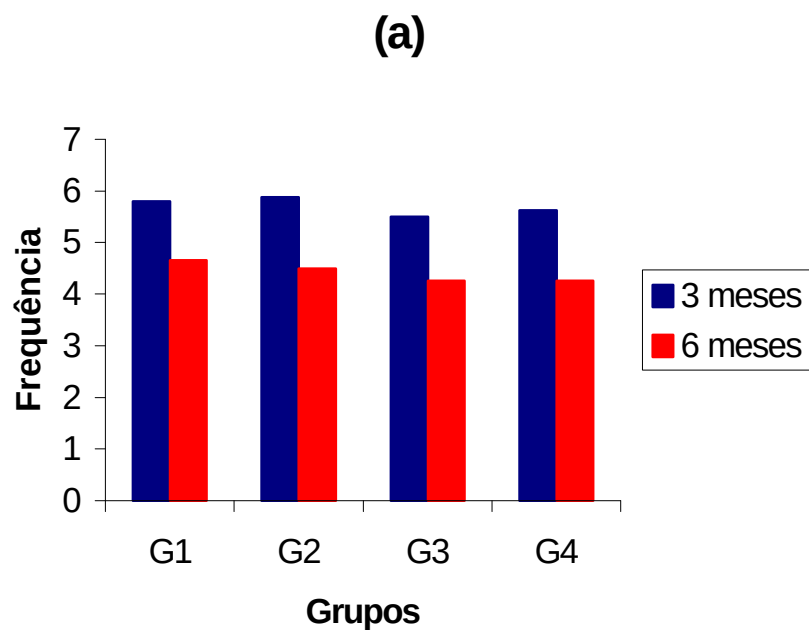


Figura 4 – Frequência de enchimento dos bebedouros aos 3 e 6 meses dos animais do sexo feminino (a) e masculino (b)

Pela análise descritiva dos dados referentes ao consumo de água, pode-se verificar que o consumo diminuiu com o passar do tempo, em todos os grupos, tanto das fêmeas quanto dos machos. Portanto, por ter o grupo

controle a mesma tendência, tal fato não pode ser atribuído à substância testada, mas talvez, por um menor requerimento dos animais com maior idade.

Comparando-se os grupos testes com o grupo controle, pode-se verificar que as fêmeas do grupo 3 e 4 ingeriram menos água que o grupo 1 e 2, entretanto, tal diferença não parece ser muito expressiva. Quanto aos machos, apesar dos grupos testes ingerirem menos água que o grupo controle, essa diferença não parece ser muito grande. Não houve diferença no consumo entre machos e fêmeas.

A variação dos pesos dos animais nas três pesagens está representada na Figura 5.

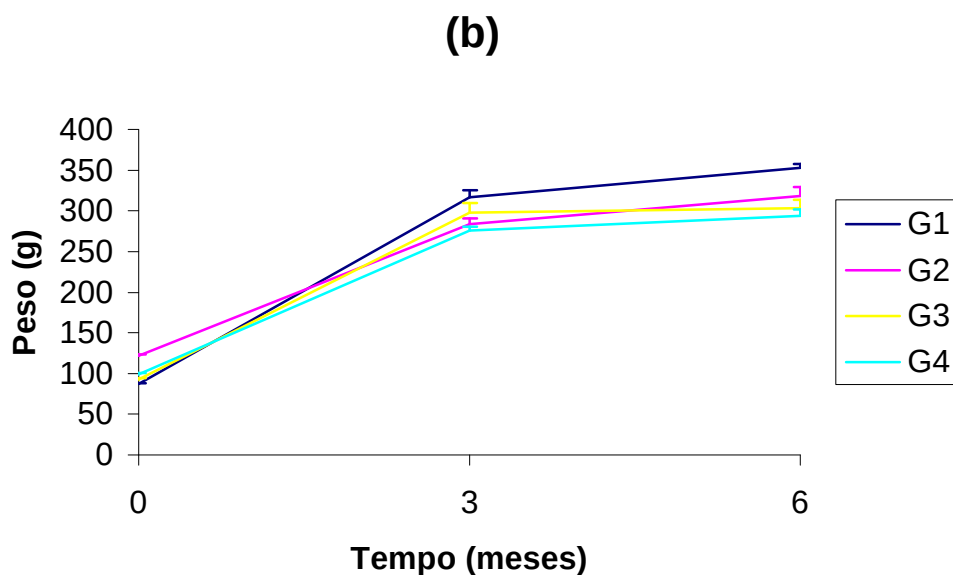
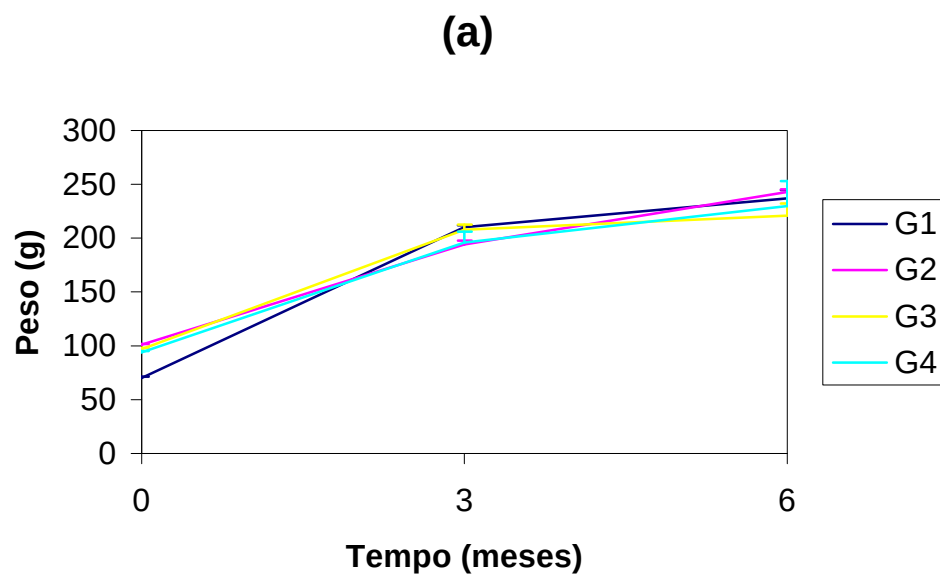


Figura 5 – Variação do peso médio dos animais do sexo feminino (a) e masculino (b), no 1º dia, aos 3 e 6 meses

Através da análise da variação dos pesos das fêmeas, podemos notar que entre os grupos 1 e 2 não houve grandes diferenças. Entretanto, entre os machos, o grupo controle apresentou melhor desempenho que os outros

grupos, o que pode ser devido ao fato de que as doses do extrato eram relativamente altas para o rato e isso pode ter levado à diminuição do consumo da ração.

4.2.2. – Dosagens bioquímicas

4.2.2.1. Colesterol total

Em relação ao colesterol total, houve diferença significativa pelo Teste F, ao nível de 5% de probabilidade entre machos e fêmeas do grupo controle e o grupo que recebeu 350 mg de bixina (3^o mês). Quanto ao tempo, houve diferença significativa no grupo dos machos que receberam 350 e 700 mg de bixina e as fêmeas que receberam 70 mg.

O grupo dos machos que mais variou em relação ao controle foi o que recebeu 700 mg de bixina, com um aumento de 53,25%, dosado no 6^o mês e essa variação não foi significativa pelo Teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade. Quanto às fêmeas, o grupo que mais variou foi o que recebeu 70 mg, dosado no 3^o mês, apresentando uma redução de 64,54% (Quadro 9).

Quadro 9 – Valores médios de colesterol total e percentual de variação em relação ao tratamento-controle, em machos e fêmeas de ratos tratados com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e aos 6 meses

Doses de Bixina (mg)	Tempo (meses)	Colesterol total (mg/dL)		Variação em relação ao controle (%)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
0	3	66,10 Ba	113,58 Aa	-	-
	6	84,98 Aa	100,00 Aa	+28,56	-11,96
70	3	55,70 Aa	40,28 Ab	-15,73	-64,54 *
	6	82,20 Aa	94,40 Aa	+24,36	-16,89
350	3	51,63 Bb	86,70 Aa	-21,89	-23,67
	6	90,97 Aa	101,05 Aa	+37,62	-11,03
700	3	58,83 Ab	79,13 Aa	-11,00	-30,33
	6	101,30 Aa	96,80 Aa	+53,25	-14,77

Em cada dose de Bixina e cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

Em cada dose de Bixina e cada sexo, a difere de b pelo teste F (P<0,05).

* Estatisticamente diferente do controle (0 mg de bixina), pelo teste de Dunnett (P<0,05).

Não houve diferença significativa quanto à dose para os grupos dos machos, em nenhum tempo, sendo que a média do 3^o mês foi de 58,07 e do 6^o mês de 89,86. Houve variação significativa quanto à dose para as fêmeas, mas no 3^o mês não houve ajuste de nenhuma equação de regressão; entretanto, no 6^o mês não houve diferença significativa e a média foi de 98,06 (Quadro 10).

Quadro 10 – Equações ajustadas aos dados de colesterol total de machos e de fêmeas de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina (B)

Característica	Sexo	Tempo (meses)	Equação ajustada	R ²
Colesterol total	Machos	3	$\bar{Y} = 58,07$	-
		6	$\bar{Y} = 89,86$	-
	Fêmeas	3	Médias observadas	-
		6	$\bar{Y} = 98,06$	-

Na Figura 6 estão apresentados os gráficos referentes à análise de regressão dos níveis de colesterol em função das doses de bixina.

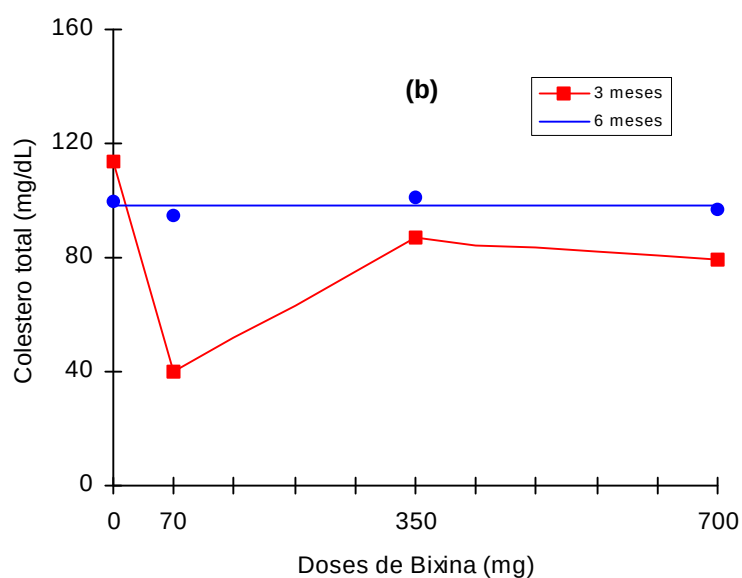
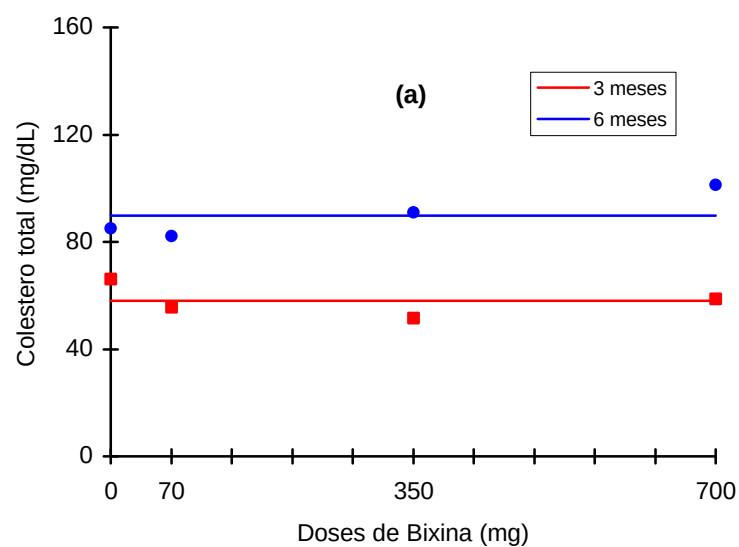


Figura 6 – Estimativas e valores médios de colesterol total de machos (a) e de fêmeas (b) de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina.

Essa diminuição do colesterol nos grupos das fêmeas pode ser explicada pelo fato de que os carotenóides podem aumentar a concentração de HDL (BENDICH, 1994) e com isso reduzir a concentração de colesterol total, já

que o HDL retira o colesterol da corrente sanguínea e o leva ao fígado para que possa ser metabolizado.

Muitos trabalhos têm demonstrado a ação hipocolesterolêmica da curcumina, que também é um carotenóide. Segundo SUBBA RAO et al (1970), a curcumina reduz os níveis séricos e hepáticos de colesterol, além de aumentar a excreção fecal de sais biliares e colesterol em ratos normais e hiperlipidêmicos.

Um aumento na atividade da enzima colesterol-7- α -hidroxilase, que é uma enzima chave na conversão de colesterol a ácidos biliares, ocorre em ratos alimentados com curcumina (SURESH BABU e SRINIVASAN (1997).

4.2.2.2. Triacilglicerol

Em relação ao triacilglicerol, houve diferença significativa pelo Teste F, ao nível de 5% de probabilidade entre machos e fêmeas que receberam 70 mg de bixina (6^o mês) e os que receberam 700 mg (3^o mês). Quanto ao tempo, houve diferença significativa no grupo dos machos que não receberam bixina, as fêmeas que receberam 70 mg e os machos que receberam 350 e 700 mg de bixina.

O grupo dos machos que mais variou em relação ao controle foi uma redução de 43,65%, no grupo que recebeu 700 mg de bixina (3^o mês) e essa variação foi significativa pelo Teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade. Quanto às fêmeas, o grupo que mais variou foi o que recebeu 70 mg (6^o mês), que foi um aumento de 18,73% (Quadro 11).

Quadro 11 – Valores médios de triacilglicerol e percentual de variação em relação ao tratamento-controle, em machos e fêmeas de ratos tratados com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e aos 6 meses

Doses de Bixina (mg)	Tempo (meses)	Triacilglicerol (mg/dL)		Variação em relação ao controle (%)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
0	3	35,58 Ab	38,70 Aa	-	-
	6	46,68 Aa	45,28 Aa	+31,20	+17,00
70	3	37,30 Aa	35,10 Ab	+4,83	-9,30
	6	34,58 Ba	45,95 Aa	-2,81	+18,73
350	3	22,30 Ab	32,83 Aa	-37,32	-15,17
	6	42,38 Aa	42,38 Aa	+19,11	+9,51
700	3	20,05 Bb	34,48 Aa	-43,65 *	-10,90
	6	40,48 Aa	39,65 Aa	+13,77	+2,45

Em cada dose de Bixina e cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

Em cada dose de Bixina e cada sexo, a difere de b pelo teste F (P<0,05).

* Estatisticamente diferente do controle (0 mg de bixina), pelo teste de Dunnett (P<0,05).

No Quadro 12 temos as médias e as equações de regressão correspondentes aos dados de triacilglicerol, em que a bixina teve efeito significativo apenas no grupo dos machos no terceiro mês e se adequou a equação de regressão.

Quadro 12 – Equações ajustadas aos dados de triacilglicerol de machos e de fêmeas de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina (B)

Característica	Sexo	Tempo (meses)	Equação ajustada	R ²
Triacilglicerol	Machos	3	$\hat{Y} = 36,0062 - 0,02571^{**}B$	0,85
		6	Médias observadas	-
	Fêmeas	3	$\bar{Y} = 35,28$	-
		6	$\bar{Y} = 43,32$	-

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

Na Figura 7 temos os gráficos da análise de regressão dos dados do triacilglicerol, em que se ajustou a equação apenas para o grupo dos machos, no 3º mês. Para os machos observa-se redução nos níveis de triacilgliceróis

dependente da dose, já para as fêmeas os valores mantiveram-se constantes e independente da dose.

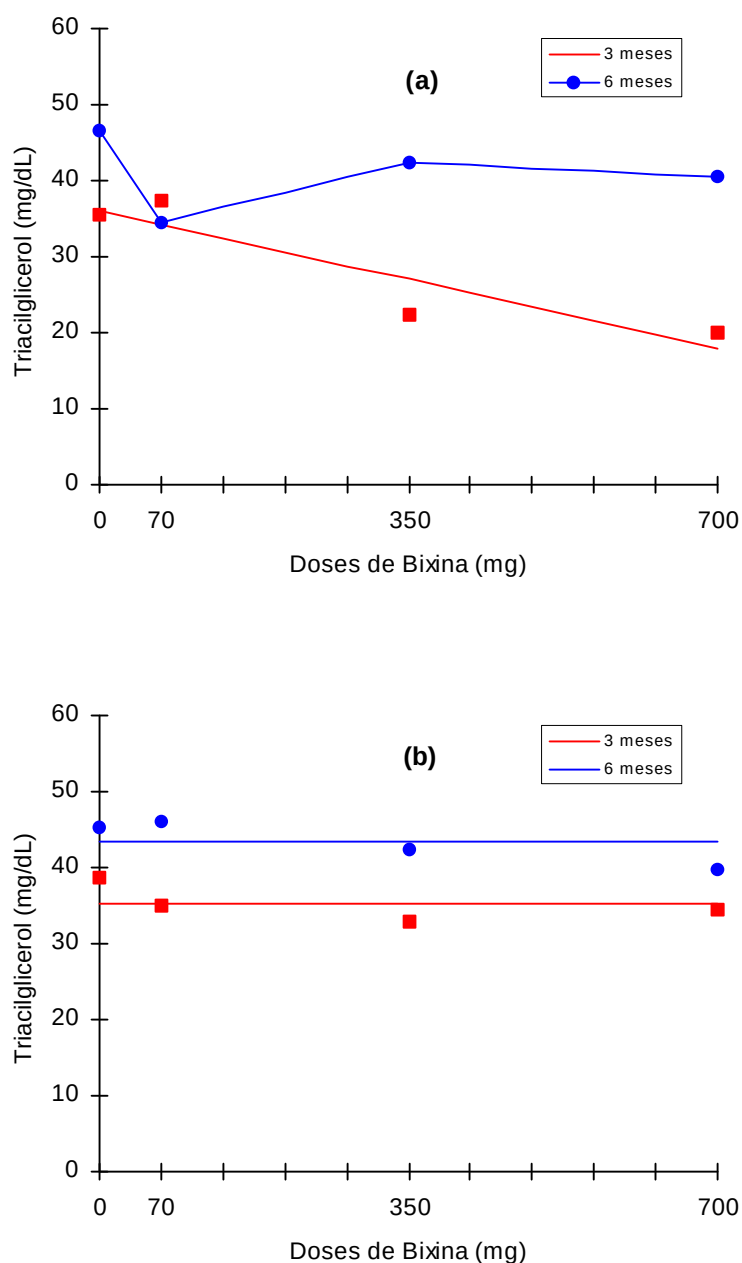


Figura 7 – Estimativas e valores médios de triacilglicerol de machos (a) e de fêmeas (b) de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina.

O efeito significativo sobre a diminuição da concentração de colesterol pode ter sido devido à ação da lipase lipoprotéica que pode ser ativada pela bixina (LIMA, 2001). O mecanismo de ação para explicar tal fato é a formação

de quelatos entre a enzima e esses compostos. Esses quelatos induzem a mudança conformacional da enzima, modificando seu centro ativo (MOULIN et al., 1994).

Um estudo realizado sobre o efeito de diversos corantes, inclusive a cúrcuma, que é um carotenóide, sobre a concentração de colesterol e triacilgliceróis, demonstrou que a cúrcuma reduziu a concentração sérica de triacilgliceróis (VALENTE, 1998).

Segundo HASMEDA e POLYA (1995), a cúrcuma estimula a conversão de AMP a AMPc. O AMPc atua estimulando a proteína quinase, que por sua vez, ativa a lipase. Essas enzimas agem hidrolisando os triacilgliceróis.

4.2.2.3. Albumina

No Quadro 13, podemos observar que houve diferença significativa pelo Teste F, ao nível de 5% de probabilidade, em relação à albumina, entre machos e fêmeas no grupo que não recebeu bixina (6^o mês). Quanto ao tempo, podemos verificar que houve diferença significativa apenas no grupo dos machos que não receberam bixina. Então podemos supor que a bixina não interfere nas dosagens de albumina, avaliando-se o tempo e o sexo, pois, apenas o grupo que não recebeu a substância teve efeito significativo.

Quadro 13 – Valores médios de albumina e percentual de variação em relação ao tratamento-controle, em machos e fêmeas de ratos tratados com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e aos 6 meses

Doses de Bixina (mg)	Tempo (meses)	Albumina (mg/dL)		Variação em relação ao controle (%)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
0	3	3,78 Aa	4,05 Aa	-	-
	6	3,27 Bb	3,98 Aa	-13,49	-1,73
70	3	4,04 Aa	4,09 Aa	+6,88	+0,99
	6	3,87 Aa	3,99 Aa	+2,38	-1,48
350	3	3,81 Aa	4,02 Aa	+0,79	-0,74
	6	4,21 Aa	4,19 Aa	+11,38	+3,46
700	3	3,78 Aa	3,87 Aa	0	-4,44
	6	4,00 Aa	4,23 Aa	+5,82	+4,44

Em cada dose de Bixina e cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

Em cada dose de Bixina e cada sexo, a difere de b pelo teste F (P<0,05).

* Estatisticamente diferente do controle (0 mg de bixina), pelo teste de Dunnett (P<0,05).

O grupo que teve maior variação em relação ao controle foi o dos machos que não receberam bixina (6^o mês), com uma diminuição de 13,49% e as fêmeas que receberam 700 mg de bixina (3^o mês), tendo uma redução de 4,44% e, no 6^o mês, um aumento de 4,44%.

No Quadro 14, pode-se observar que a bixina teve efeito significativo somente no grupo dos machos no 6^o mês e foi ajustada uma equação de regressão.

Quadro 14 – Equações ajustadas aos dados de albumina de machos e de fêmeas de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina (B)

Característica	Sexo	Tempo (meses)	Equação ajustada	R ²
Albumina	Machos	3	$\bar{Y} = 3,85$	-
		6	$\hat{Y} = 3,4101 + 0,004161^{**}B - 0,000004768^{**}B^2$	0,87
	Fêmeas	3	$\bar{Y} = 4,01$	-
		6	$\bar{Y} = 4,10$	-

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

Pela Figura 8 podemos verificar as análises de regressão, que avaliam o efeito das doses. Observa-se que houve um aumento na concentração de albumina sérica nos grupos de machos que receberam a bixina em relação ao grupo controle, no sexto mês de experimento. Entretanto, no terceiro mês e em

fêmeas (3^o e 6^o mês) não houve diferença significativa entre as diferentes doses de bixina ingeridas.

A concentração de albumina sérica só se encontram elevados nos casos de hemoconcentração ou desidratação. Segundo ALCÂNTARA (1985), quando se anestesia os animais utilizando éter pode ocorrer hemoconcentração.

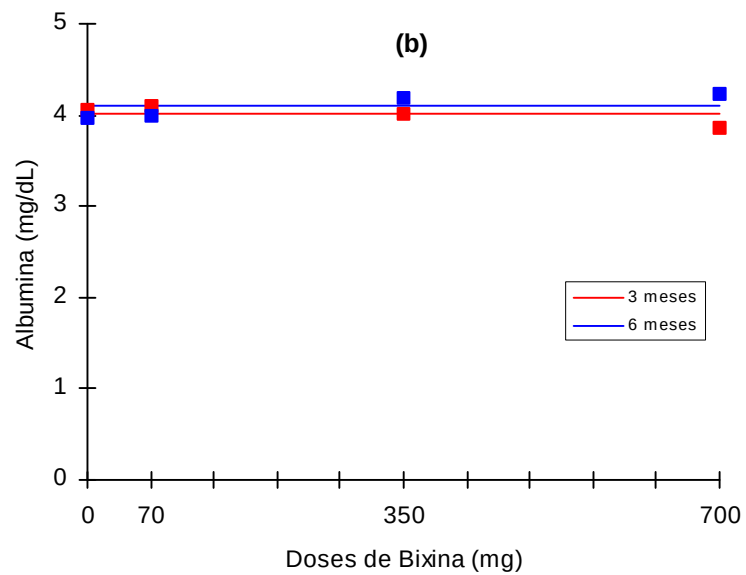
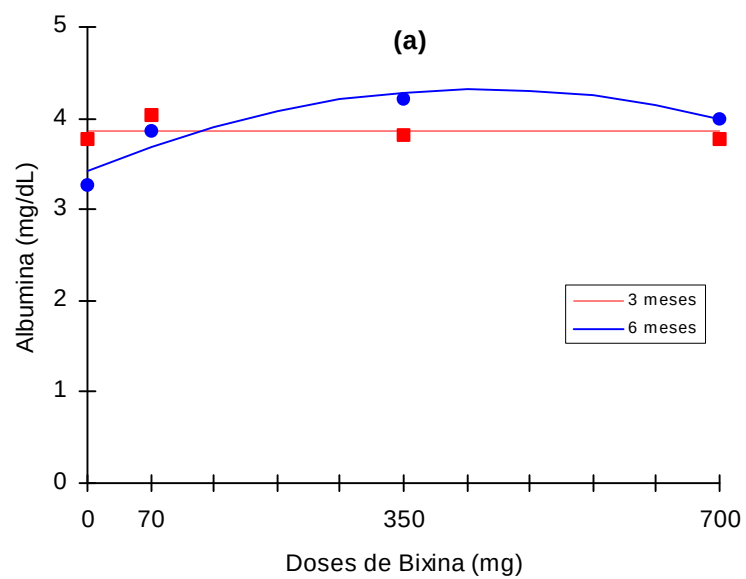


Figura 8 – Estimativas de albumina de machos (a) e de fêmeas (b) de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina.

4.2.2.4. Creatinina

Os níveis de creatinina de machos e fêmeas do grupo que não recebeu bixina (6^o mês) e do que recebeu 350 mg de bixina (6^o mês) diferiram estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste de Dunnett. Quanto ao tempo, houve diferença significativa entre o 3^o e 6^o mês, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett, no grupo controle das fêmeas, machos e fêmeas que receberam 70 mg de bixina e fêmeas que receberam 350 e 700 mg de bixina. Com isso, podemos notar que o tempo teve maior interferência que o sexo, o que pode ser devido à relação com a quantidade final ingerida ao longo do experimento, levando-nos a supor que o metabolismo da creatinina sofre interferência da quantidade de bixina ao longo do tempo, ou que com o envelhecimento do animal tal metabolismo pode ser alterado. No grupo dos machos o que sofreu maior variação em relação ao grupo controle foi o que recebeu 70 mg (6^o mês), com um aumento de 52,17%. E no grupo das fêmeas foi o que recebeu 700 mg, onde houve um decréscimo de 40% (Quadro 15).

Quadro 15 – Valores médios de creatinina e percentual de variação em relação ao tratamento-controle, em machos e fêmeas de ratos tratados com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e aos 6 meses

Doses de Bixina (mg)	Tempo (meses)	Creatinina (mg/dL)		Variação em relação ao controle (%)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
0	3	0,46 Aa	0,55 Ab	-	-
	6	0,40 Ba	0,71 Aa	-13,04	+29,09
70	3	0,44 Ab	0,47 Ab	-4,35	-14,55
	6	0,70 Aa	0,64 Aa	+52,17 *	+16,36
350	3	0,36 Aa	0,44 Ab	-21,74	-20,00
	6	0,50 Ba	0,69 Aa	+8,70	+25,45
700	3	0,37 Aa	0,33 Ab	-19,57	-40,00 *
	6	0,48 Aa	0,52 Aa	+4,35	-5,45

Em cada dose de Bixina e cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

Em cada dose de Bixina e cada sexo, a difere de b pelo teste F (P<0,05).

* Estatisticamente diferente do controle (0 mg de bixina), pelo teste de Dunnett (P<0,05).

Quanto à dosagem, podemos verificar que os grupos dos machos (3^o mês) não tiveram diferença significativa entre si e a média de creatinina foi de 0,41 mg/dL. Só houve diferença significativa quanto à dose no 6^o mês, mas não

houve adequação de nenhuma equação de regressão. Entretanto, houve diferença significativa quanto à dose no grupo das fêmeas, tanto no 3^o como no 6^o mês (Quadro 16).

Quadro 16 – Equações ajustadas aos dados de creatinina de machos e de fêmeas de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina (B)

Característica	Sexo	Tempo (meses)	Equação ajustada	R ²
Creatinina	Machos	3	$\bar{Y} = 0,41$	-
		6	Médias observadas	-
	Fêmeas	3	$\hat{Y} = 0,5230 - 0,0002719^{**}B$	0,92
		6	$\hat{Y} = 0,7072 - 0,0002356^{*}B$	0,68

** e * Significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Na Figura 9 estão apresentadas as estimativas e valores médios de creatinina. No grupo dos machos, no terceiro mês, não houve diferença significativa em relação ao controle, entretanto, no sexto mês, houve aumento nos grupos que receberam bixina, sendo o maior aumento, no grupo que recebeu 70 mg. No grupo das fêmeas houve redução significativa, tanto no terceiro quanto no sexto mês de experimento, sendo que a redução ocorreu à medida que foi aumentando a dose de bixina, levando-nos à conclusão de que a bixina tem efeito sobre o metabolismo da creatinina.

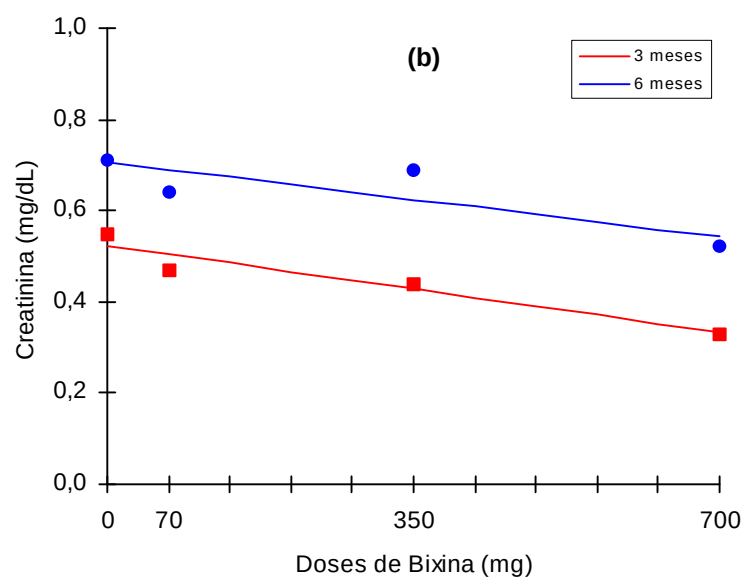
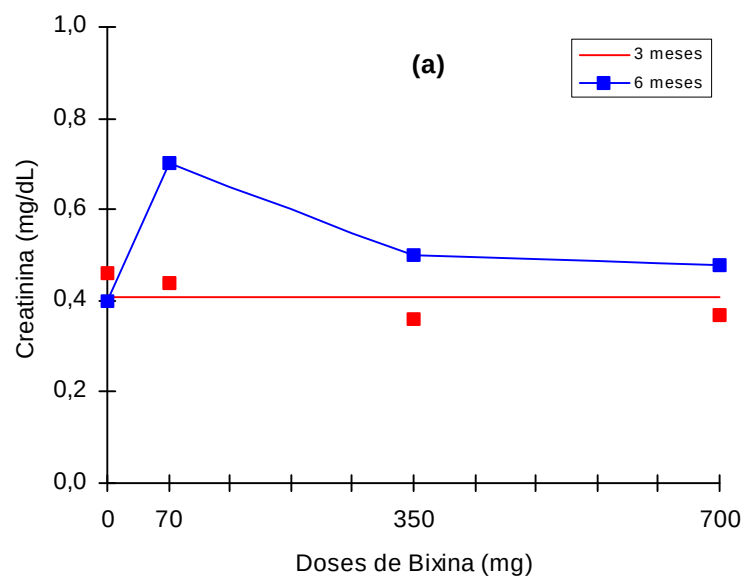


Figura 9 – Estimativas e valores médios de creatinina de machos (a) e de fêmeas (b) de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina.

4.2.2.5. Uréia

A concentração de uréia não depende somente da filtração glomerular, mas também do fluxo urinário de sua produção, que depende da ingestão

alimentar de protídios e do catabolismo protéico endógeno, sendo a creatinemia um parâmetro muito mais válido para acompanhar a evolução de uma insuficiência renal que a uréia sanguínea (FREJAVILLE, 1989).

No Quadro 17 podemos verificar que houve diferença significativa entre machos e fêmeas, ao nível de 5% pelo Teste F, em relação à uréia, no grupo que não recebeu bixina, tanto no terceiro quanto no sexto mês. Quanto ao tempo, não houve diferença significativa em nenhum grupo. Isto nos leva a crer que essa alteração nos níveis de uréia é devido a uma diferença normal entre sexos, e como, não houve diferença nos grupos que receberam a bixina, podemos concluir que tal substância alterou os níveis de uréia dos animais, havendo um aumento nos machos e diminuição nas fêmeas em relação ao controle, levando a uma relativa equiparação.

Quadro 17 – Valores médios de uréia e percentual de variação em relação ao tratamento-controle, em machos e fêmeas de ratos tratados com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e aos 6 meses

Doses de Bixina (mg)	Tempo (meses)	Uréia (mg/dL)		Variação em relação ao controle (%)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
0	3	37,23 Ba	58,90 Aa	-	-
	6	25,39 Ba	53,13 Aa	-34,80	-9,80
70	3	43,73 Aa	47,10 Aa	+17,46	-20,03
	6	47,65 Aa	42,30 Aa	+27,99	-28,18
350	3	40,78 Aa	45,93 Aa	+9,54	-22,02
	6	44,85 Aa	39,33 Aa	+20,47	-33,23
700	3	37,83 Aa	39,15 Aa	+1,61	-33,53
	6	49,00 Aa	50,78 Aa	+31,61	-13,79

Em cada dose de Bixina e cada tempo, A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Em cada dose de Bixina e cada sexo, a difere de b pelo teste F ($P < 0,05$).

* Estatisticamente diferente do controle (0 mg de bixina), pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Pelo Quadro 18, podemos observar que quanto às doses houve diferença significativa no grupo dos machos no sexto mês, mas não se adequou nenhuma equação de regressão. E houve diferença significativa no grupo das fêmeas dosado no terceiro mês.

Quadro 18 – Equações ajustadas aos dados de uréia de machos e de fêmeas de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina (B)

Característica	Sexo	Tempo (meses)	Equação ajustada	R ²
Uréia	Machos	3	$\bar{Y} = 39,89$	-
		6	Médias observadas	-
	Fêmeas	3	$\hat{Y} = 53,9671 - 0,02214 * B$	0,74
		6	$\bar{Y} = 46,39$	-

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste t.

Pela Figura 10 pode-se observar a concentração de uréia em função das doses de bixina para os machos. Não houve alterações na concentração de uréia em nenhum dos grupos em relação ao controle aos três meses. Houve um aumento da concentração de uréia nos grupos que receberam bixina, no sexto mês. Entretanto, no grupo das fêmeas, houve redução da concentração de uréia em relação ao grupo controle, no terceiro mês, e essa redução se deu proporcionalmente ao aumento das doses de bixina. No sexto mês não houve alteração.

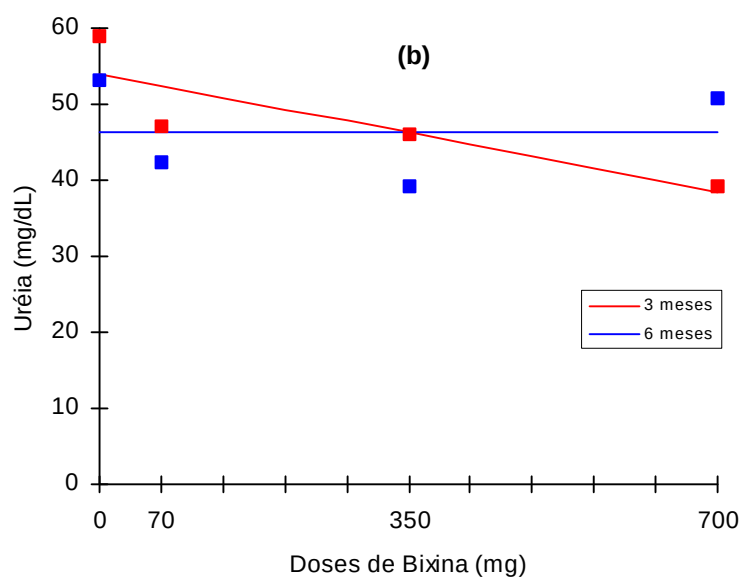
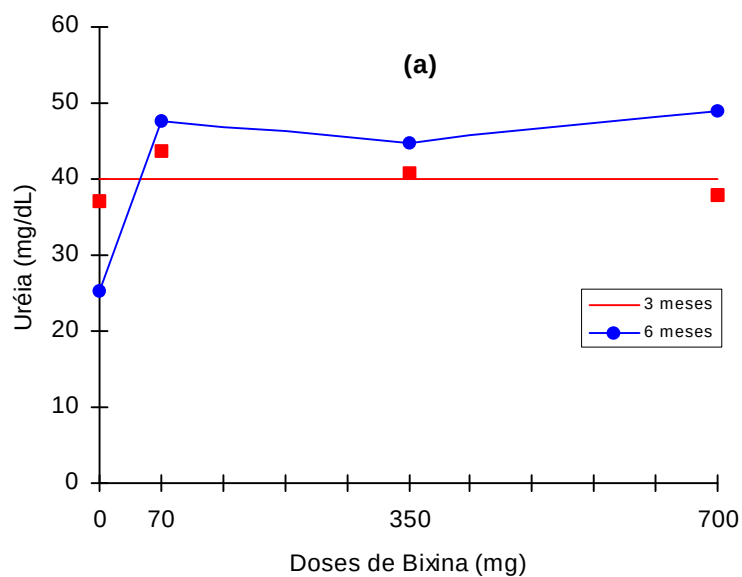


Figura 10 – Estimativas e valores médios de uréia de machos (a) e de fêmeas (b) de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina.

A relação uréia sanguínea/creatininemia é um importante fator para melhor analisar, face a concentração de uréia sanguínea elevada, o papel dos fatores renais e extra-renais. Assim, quando esta relação for superior a 20, poderá tratar-se de uma ingestão excessiva de proteínas em um caso de

insuficiência renal, ou da presença de sangue no tubo digestivo, de insuficiência renal funcional por desidratação, hipovolemia ou insuficiência cardíaca (FREJAVILLE, 1989). No presente estudo todos os grupos tiveram relação superior a 20, porém, mesmo o grupo controle apresentou níveis aumentados de uréia. O normal segundo CRISPENS Jr. (1975) é de 35,3 – 38,3 mg/dL. Isto pode ser devido a um problema renal decorrente da intoxicação dos animais pelo cobre proveniente do bebedouro dos animais.

4.2.2.6. Glicose

Os machos e fêmeas diferiram significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste F, em relação à concentração de glicose, somente no grupo controle (3^o mês).

A maior variação em relação ao controle se deu, quanto aos machos, no grupo que recebeu 350 mg de bixina (6^o mês), com um decréscimo de 47,45%, sendo essa variação significativa, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett. Quanto às fêmeas a maior variação foi o grupo que recebeu 700mg, com elevação da concentração sérica de glicose de 34,50, porém essa variação não foi significativa (Quadro 19).

Quadro 19 – Valores médios de glicose e percentual de variação em relação ao tratamento-controle, em machos e fêmeas de ratos tratados com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e aos 6 meses

Doses de Bixina (mg)	Tempo (meses)	Glicose (mg/dL)		Variação em relação ao controle (%)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
0	3	217,70 Aa	153,83 Ba	-	-
	6	172,28 Aa	141,78 Aa	-20,86	-7,83
70	3	240,03 Aa	203,15 Aa	+10,26	+32,06
	6	144,20 Ab	157,23 Aa	-33,76	+2,21
350	3	188,20 Aa	167,45 Aa	-13,55	+8,85
	6	114,40 Ab	166,30 Aa	-47,45 *	+8,11
700	3	211,08 Aa	206,90 Aa	-3,04	+34,50
	6	136,95 Ab	128,53 Ab	-37,09 *	-16,45

Em cada dose de Bixina e cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

Em cada dose de Bixina e cada sexo, a difere de b pelo teste F (P<0,05).

* Estatisticamente diferente do controle (0 mg de bixina), pelo teste de Dunnett (P<0,05).

Pelo Quadro 20 podemos verificar que houve diferença significativa, quanto às doses, apenas no grupo das fêmeas dosadas no terceiro mês, no entanto, não se ajustou nenhuma equação de regressão.

Quadro 20 – Equações ajustadas aos dados de glicose de machos e de fêmeas de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina (B)

Característica	Sexo	Tempo (meses)	Equação ajustada	R ²
Glicose	Machos	3	$\bar{Y} = 214,25$	-
		6	$\bar{Y} = 141,96$	-
	Fêmeas	3	Médias observadas	-
		6	$\bar{Y} = 148,46$	-

Na Figura 11 podemos observar o efeito das doses sobre os níveis de glicose nos animais.

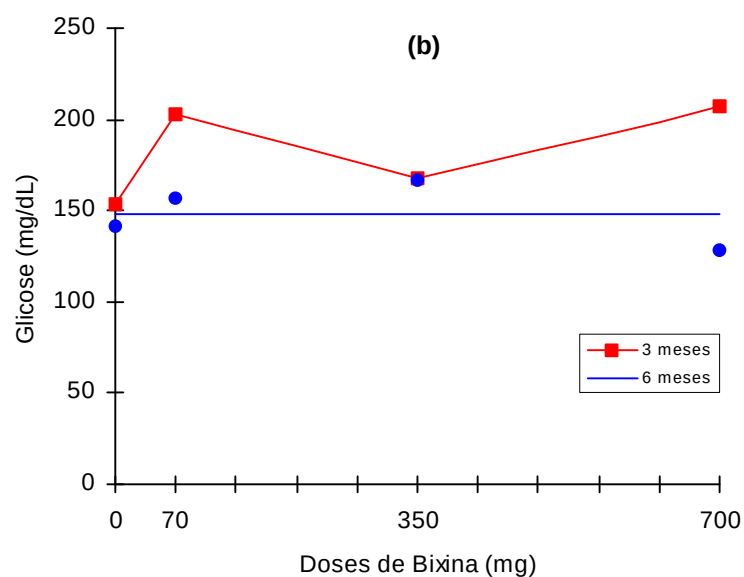
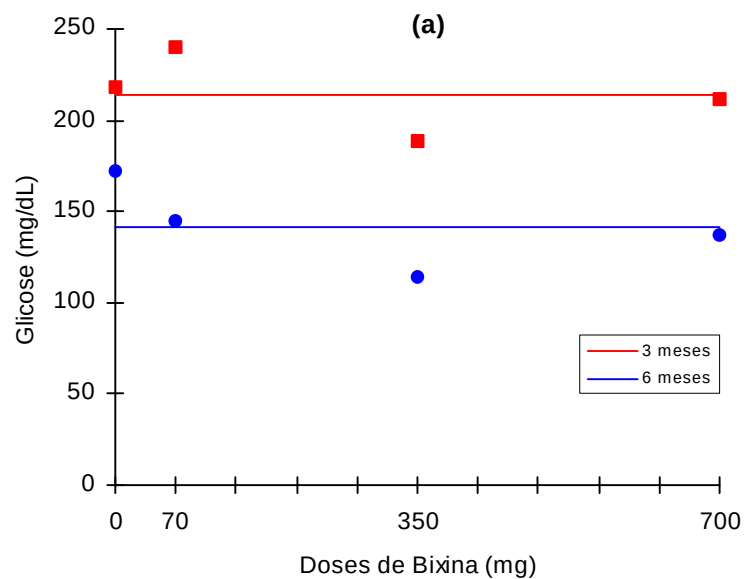


Figura 11 – Estimativas e valores médios de glicose de machos (a) e de fêmeas (b) de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina.

A concentração sérica de glicose dos animais de ambos os sexos, inclusive os do controle, encontra-se elevada, pois, segundo CRISPENS Jr. (1975) o valor considerado normal é 70 mg/dL. Uma provável explicação para este fato é que estes animais foram anestesiados com éter e nesta situação a

glicemia pode tornar-se alta (LIMA et al, 1985 e ALCÂNTARA, 1985). Os machos tiveram sua concentração sérica de glicose diminuída no sexto mês em relação ao terceiro, porém, esta não diferiu significativamente em relação ao controle. O comportamento das fêmeas foi semelhante aos machos no que diz respeito à diminuição da concentração no sexto mês e a não existência de diferença significativa dos grupos que receberam bixina em relação ao controle (6^o mês), porém, no terceiro mês os grupos que receberam a substância diferiram entre si, sem uma devida adequação de equação de regressão.

Esses dados não concordam com os obtidos por MORRISON e WEST (1985), em que cães de ambos os sexos receberam extrato oleoso de urucum e obtiveram uma diminuição na concentração de glicose. Embora nesse estudo animais de ambos os sexos tenham sido usados, não houve análise separada por sexo, o que pode ter levado ao mascaramento do efeito nas fêmeas.

4.2.2.7. Cálcio

A concentração sérica de cálcio foi significativamente diferente entre os sexos, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste F, no grupo que não recebeu bixina (6^o mês) e no grupo que recebeu 350 mg (3^o mês). Quanto ao tempo, houve diferença no grupo dos machos que não receberam bixina, das fêmeas e machos que receberam 70 mg e os machos que receberam 350 e 700 mg de bixina. Com isso podemos concluir que o fator tempo teve mais efeito sobre os níveis de cálcio do que o fator sexo.

O grupo dos machos que mais sofreu variação foi o que não recebeu bixina (6^o mês), que teve sua concentração reduzida em 20,79%, sendo esta significativa, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste de Dunnett. O grupo das fêmeas que mais variou foi o que recebeu 70 mg (3^o mês), que teve seus níveis aumentados em 10,80% (Quadro 21).

Quadro 21 – Valores médios de cálcio e percentual de variação em relação ao tratamento-controle, em machos e fêmeas de ratos tratados com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e aos 6 meses

Doses de	Cálcio (mg/dL)	Variação em relação ao controle (%)
----------	----------------	-------------------------------------

Bixina (mg)	Tempo (meses)	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
0	3	10,58 Aa	10,00 Aa	-	-
	6	8,38 Bb	10,76 Aa	-20,79 *	+7,60
70	3	11,22 Aa	11,08 Aa	+6,05	+10,80
	6	9,01 Ab	9,32 Ab	-14,84	-6,80
350	3	12,38 Aa	10,04 Ba	+17,01	+0,40
	6	8,82 Ab	9,30 Aa	-16,64	-7,00
700	3	11,48 Aa	10,16 Aa	+8,51	+1,60
	6	8,71 Ab	9,16 Aa	-17,67	-8,40

Em cada dose de Bixina e cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

Em cada dose de Bixina e cada sexo, a difere de b pelo teste F (P<0,05).

* Estatisticamente diferente do controle (0 mg de bixina), pelo teste de Dunnett (P<0,05).

Quanto às doses, podemos verificar no Quadro 22, que houve efeito significativo apenas no grupo dos machos (3^o mês).

Quadro 22 – Equações ajustadas aos dados de cálcio de machos e de fêmeas de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina (B)

Característica	Sexo	Tempo (meses)	Equação ajustada	R ²
Cálcio	Machos	3	$\hat{Y} = 10,6050 + 0,008962 B - 0,00001103 * B^2$	0,99
		6	$\bar{Y} = 8,73$	-
	Fêmeas	3	$\bar{Y} = 10,32$	-
		6	$\bar{Y} = 9,64$	-

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste t.

Pela Figura 12 podemos observar a tendência das estimativas do cálcio dos dois sexos, em função das doses de bixina.

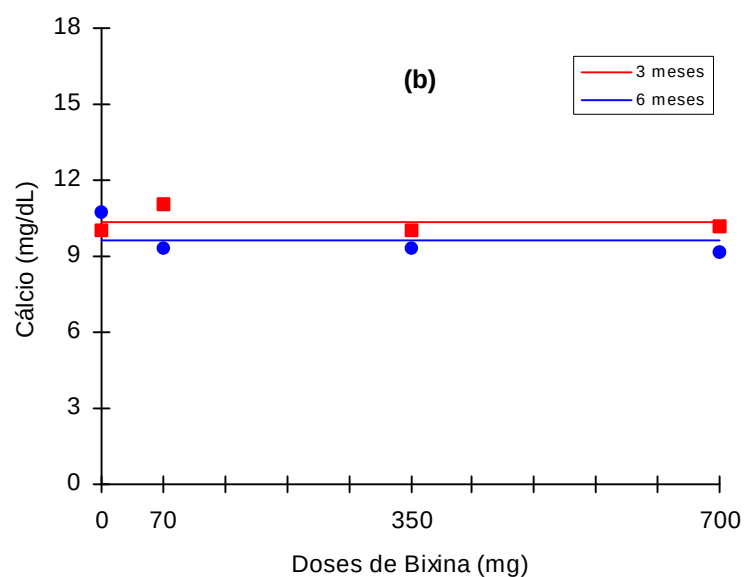
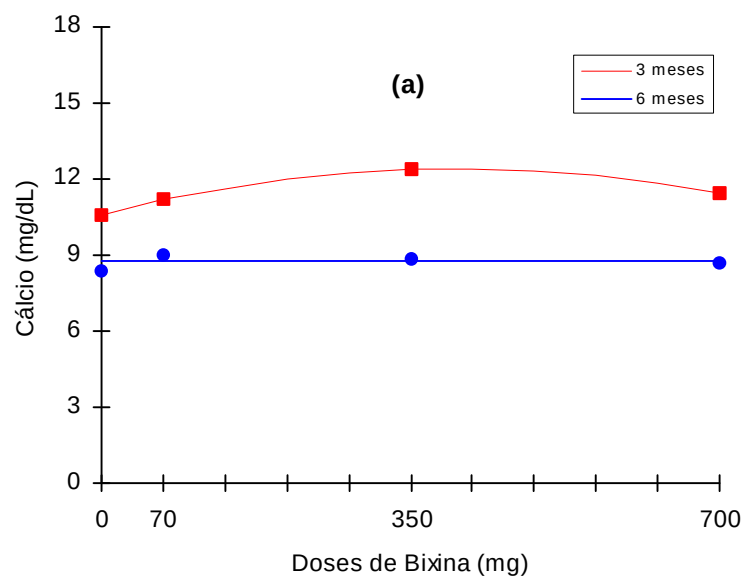


Figura 12 – Estimativas de cálcio de machos (a) e de fêmeas (b) de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina.

A concentração de cálcio dos machos diminuiu no 6^o mês em relação ao 3^o, sendo que, no 6^o mês não houve diferença entre os tratamentos. No 3^o mês houve um aumento na concentração em relação ao controle. As fêmeas seguiram a mesma tendência dos machos no que diz respeito à diminuição na

concentração do 6^o mês em relação ao 3^o, porém, em nenhum tempo houve diferença significativa entre os grupos.

Existem variações fisiológicas de calcemia conforme a idade e o sexo. No homem adulto, a concentração de cálcio diminui com a idade, enquanto, na mulher, as variações são mínimas (FREJAVILLE, 1989). Os dados obtidos neste estudo concordam com o referido acima. Se compararmos as concentrações séricas de cálcio, poderemos verificar que houve diminuição do 3^o para o 6^o mês entre os machos, porém, entre as fêmeas, quase não houve alteração.

4.2.2.8. Fósforo

Pelo Quadro 23 podemos verificar que existe diferença significativa entre os sexos em relação ao fósforo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste F, no grupo que não recebeu bixina e nos grupos que receberam 350 e 700 mg de bixina (6^o mês).

Houve diferença significativa em relação ao tempo, no grupo de machos que não recebeu bixina e nos grupos que receberam 700 mg de bixina (3^o e 6^o mês). Com isso, notamos que tanto o fator sexo quanto o tempo interferem na concentração de fósforo.

A maior variação ocorrida entre os machos em relação ao controle, foi do grupo que recebeu 700 mg (3^o mês), que teve um aumento de 18,62% e quanto às fêmeas, o grupo que mais variou foi o que recebeu 700 mg de bixina (6^o mês), cujo grupo teve sua concentração aumentada em 27,78% e esta foi significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett.

Em relação às diferentes doses, houve diferença significativa apenas no grupo das fêmeas dosadas no sexto mês (Quadro 24).

Quadro 23 – Valores médios de fósforo e percentual de variação em relação ao tratamento-controle, em machos e fêmeas de ratos tratados com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e aos 6 meses

Doses de Bixina	Tempo	Fósforo (mg/dL)	Variação em relação ao controle (%)

(mg)	(meses)	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
0	3	7,84 Aa	8,17 Ab	-	-
	6	8,09 Ba	10,10 Aa	+3,19	+23,62
70	3	8,51 Aa	7,68 Aa	+8,55	-6,00
	6	8,18 Aa	7,38 Aa	+4,34	-9,67
350	3	8,55 Aa	7,31 Aa	+9,06	-10,53
	6	8,96 Aa	7,31 Ba	+14,29	-10,53
700	3	9,30 Aa	8,34 Ab	+18,62	+2,08
	6	7,64 Bb	10,44 Aa	-2,55	+27,78 *

Em cada dose de Bixina e cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

Em cada dose de Bixina e cada sexo, a difere de b pelo teste F (P<0,05).

* Estatisticamente diferente do controle (0 mg de bixina), pelo teste de Dunnett (P<0,05).

Quadro 24 – Equações ajustadas aos dados de fósforo de machos e de fêmeas de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina (B)

Característica	Sexo	Tempo (meses)	Equação ajustada	R ²
Fósforo	Machos	3	$\bar{Y} = 8,55$	-
		6	$\bar{Y} = 8,22$	-
	Fêmeas	3	$\bar{Y} = 7,88$	-
		6	$\hat{Y} = 9,3629 - 0,01549 B + 0,00002448 B^2$	0,80

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Na Figura 13 estão apresentados os gráficos referentes às estimativas de fósforo em função das doses de bixina.

A concentração de fósforo no sexto mês sofreu uma diminuição em relação ao terceiro mês, porém, em nenhum dos tempos, houve diferença significativa entre os tratamentos. Quanto às fêmeas não houve diferença significativa entre os grupos no terceiro mês e no sexto mês houve uma redução, com nível mínimo no grupo que recebeu 350 mg de bixina e novamente aumento com pico máximo no grupo que recebeu 700 mg de bixina.

Esses dados concordam com o que descreve FREJAVILLE (1989) no que diz respeito à concentração de fósforo de mulheres, que seguem uma tendência de diminuir com a idade e depois voltar a aumentar. Entretanto, quanto ao homem não condiz, pois para os autores existe uma tendência da concentração sérica de fósforo diminuir com o avanço da idade e no estudo em questão, praticamente as concentrações mantiveram-se inalteradas.

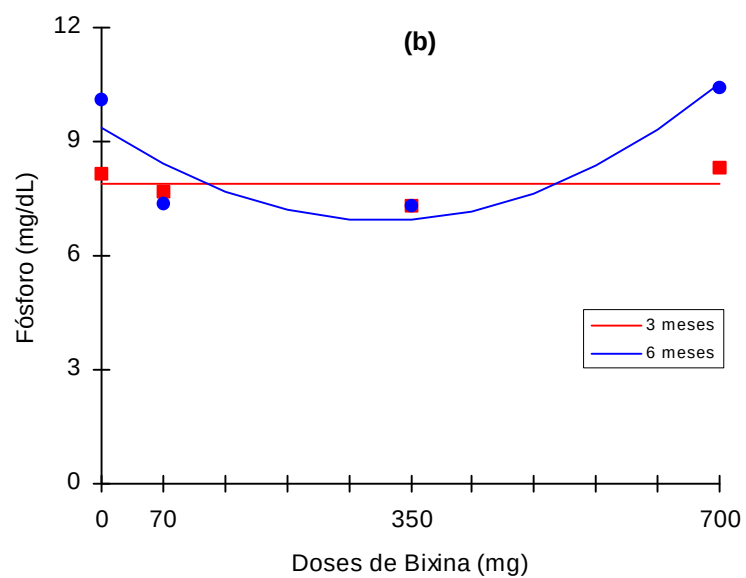
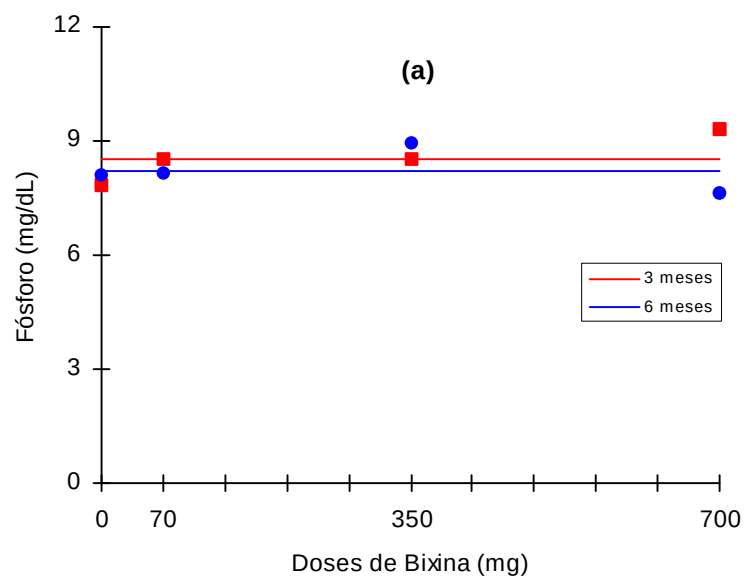


Figura 13 – Estimativas de fósforo de machos (a) e de fêmeas (b) de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina.

4.2.2.9. Relação Ca:P

Quanto à relação Ca:P pode ser verificada que as diferenças significativas entre os sexos, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste F, ocorreram no grupo que recebeu 350 e 700 mg de bixina (6^o mês). O fator tempo interferiu na relação Ca:P no grupo controle dos machos, no grupo dos machos que receberam 70 e 350 mg de bixina e no das fêmeas que receberam 700 mg de bixina.

A maior variação foi uma redução de 26,67% no grupo dos machos que receberam 350 mg de bixina (6^o mês) e uma redução de 26,83% no grupo das fêmeas que receberam 700 mg de bixina (6^o mês), sendo ambos os resultados significativos, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste de Dunnett (Quadro 25).

Quadro 25 – Valores médios de relação cálcio:fósforo e percentual de variação em relação ao tratamento-controle, em machos e fêmeas de ratos tratados com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e aos 6 meses

Doses de Bixina (mg)	Tempo (meses)	Relação Ca:P		Variação em relação ao controle (%)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
0	3	1,35 Aa	1,23 Aa	-	-
	6	1,04 Ab	1,08 Aa	-22,96 *	-12,20
70	3	1,32 Aa	1,46 Aa	-2,22	+18,70
	6	1,11 Ab	1,27 Aa	-17,78	+3,25
350	3	1,46 Aa	1,38 Aa	+7,41	+12,20
	6	0,99 Bb	1,28 Aa	-26,67 *	+4,07
700	3	1,24 Aa	1,22 Aa	-8,15	-0,81
	6	1,16 Aa	0,90 Bb	-14,07	-26,83 *

Em cada dose de Bixina e cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

Em cada dose de Bixina e cada sexo, a difere de b pelo teste F (P<0,05).

* Estatisticamente diferente do controle (0 mg de bixina), pelo teste de Dunnett (P<0,05).

Quanto às doses houve diferença significativa, como podemos verificar no Quadro 26, apenas no grupo das fêmeas (6^o mês). Houve diferença significativa no grupo das fêmeas dosado no terceiro mês, mas não houve adequação de nenhuma equação de regressão.

Quadro 26 – Equações ajustadas aos dados da relação cálcio: fósforo de machos e de fêmeas de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina (B)

Característica	Sexo	Tempo (meses)	Equação ajustada	R ²
Relação Ca:P	Machos	3	$\bar{Y} = 1,34$	-
		6	$\bar{Y} = 1,08$	-
	Fêmeas	3	Médias observadas	-
		6	$\hat{Y} = 1,1213 + 0,001372 * B - 0,000002415 ** B^2$	0,93

** e * Significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Pela Figura 14 podemos verificar os gráficos referentes às estimativas da relação Ca:P em função das doses de bixina.

A relação Ca:P sofreu uma redução no sexto mês se comparada ao terceiro, nos grupos dos machos, não havendo, entretanto, diferença significativa entre os tratamentos. Quanto às fêmeas, houve também uma redução na relação Ca:P no sexto mês em relação ao terceiro. Tanto no terceiro quanto no sexto mês, houve um ligeiro aumento nessa relação até os níveis de 350 mg de bixina e depois houve uma redução. Porém, no terceiro mês, o pico máximo foi verificado no grupo que recebeu 70 mg de bixina.

A relação Ca:P foi muito enfatizada no passado, mas um estudo mostrou pouca ou nenhuma influência dessa relação em se variando as ingestões de cálcio e fósforo, onde, se a dieta contiver cálcio suficiente sua absorção não seria afetada (CARRAZA, 1988). Nornan (1978), citado por CARRAZA (1988), esclarece que os problemas de absorção intestinal de cálcio e fósforo devem ser apreciados de maneira integrada com outros fatores da homeostasia do cálcio, e que as vias de absorção intestinal de cálcio e fósforo são dissociadas, favorecendo as absorções independentes.

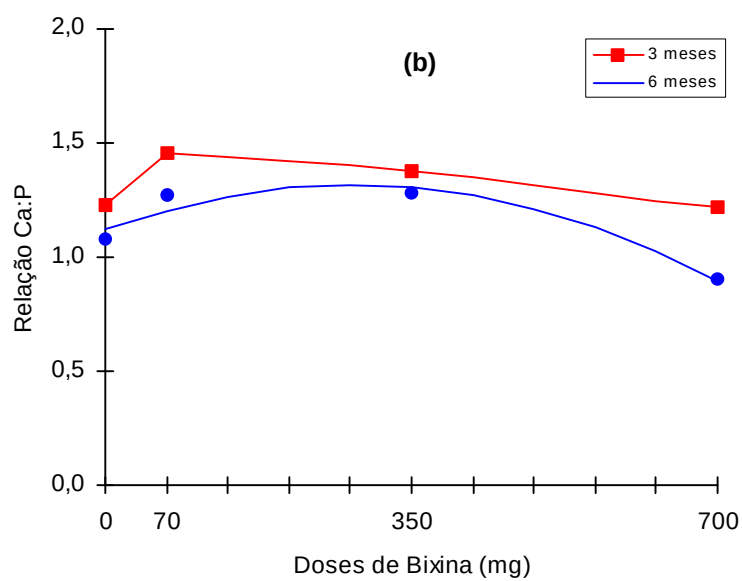
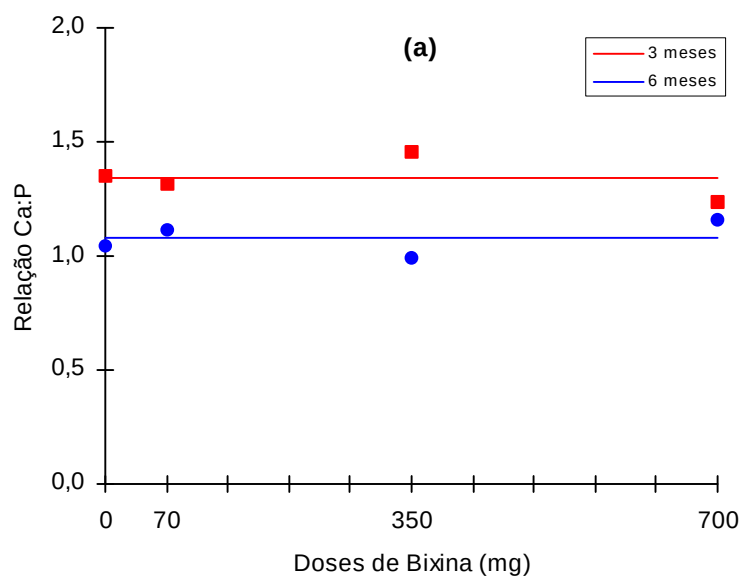


Figura 14 – Estimativas e valores médios da relação cálcio:fósforo de machos (a) e de fêmeas (b) de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina.

4.2.2.10. Bilirrubina direta

Em relação ao fator sexo, houve diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste F, em relação à bilirrubina direta para o grupo que

recebeu 70 mg de bixina (6^o mês), e quanto ao fator tempo, os grupos que apresentaram diferenças significativas foram o das fêmeas e dos machos que receberam 700 mg de bixina.

Nos grupos dos machos o que apresentou maior variação em relação ao controle foi o que recebeu 700 mg de bixina (6^o mês) e esta variação correspondeu a um aumento de 112,50%, sendo não significativo, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett. Nos grupos das fêmeas, o que maior variação sofreu foi igualmente o grupo que recebeu 700 mg de bixina (6^o mês), apresentando um aumento de 183,33%, que foi significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett (Quadro 27).

Quadro 27 – Valores médios de bilirrubina direta e percentual de variação em relação ao tratamento-controle, em machos e fêmeas de ratos tratados com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e aos 6 meses

Doses de Bixina (mg)	Tempo (meses)	Bilirrubina direta (mg/dL)		Variação em relação ao controle (%)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
0	3	0,08 Aa	0,06 Aa	-	-
	6	0,11 Aa	0,08 Aa	+37,50	+33,33
70	3	0,11 Aa	0,07 Aa	+37,50	+16,67
	6	0,14 Aa	0,06 Ba	+75,00	0
350	3	0,09 Aa	0,10 Aa	+12,50	+66,67
	6	0,15 Aa	0,12 Aa	+87,50	+100,00
700	3	0,08 Ab	0,09 Ab	0	+50,00
	6	0,17 Aa	0,17 Aa	+112,50	+183,33 *

Em cada dose de Bixina e cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

Em cada dose de Bixina e cada sexo, a difere de b pelo teste F (P<0,05).

* Estatisticamente diferente do controle (0 mg de bixina), pelo teste de Dunnett (P<0,05).

No Quadro 28 estão apresentadas as equações referentes aos dados da bilirrubina direta, e através deste podemos verificar que a dose que apresentou diferença significativa foi do grupo das fêmeas dosadas no sexto mês.

Quadro 28 – Equações ajustadas aos dados de bilirrubina direta de machos e de fêmeas de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina (B)

Característica	Sexo	Tempo (meses)	Equação ajustada	R ²
Bilirrubina Direta	Machos	3	$\bar{Y} = 0,09$	-
		6	$\bar{Y} = 0,14$	-
	Fêmeas	3	$\bar{Y} = 8,73$	-
		6	$\hat{Y} = 0,06401 + 0,0001486^{**}B$	0,94

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Na Figura 15 estão apresentados os gráficos referentes às diferentes doses de bixina em relação à concentração de bilirrubina.

Por eles podemos verificar que nos grupos dos machos, tanto o dosado no terceiro quanto o dosado no sexto mês, não houve diferença significativa entre as doses, levando-nos a crer que tal substância não interfere na concentração de bilirrubina direta em machos. Nos grupos das fêmeas, o mesmo aconteceu com o grupo dosado no terceiro mês. Entretanto, no dosado no sexto mês houve um aumento significativo com o aumento das doses de bixina. Pode-se concluir que a bixina pode interferir na concentração de bilirrubina direta em fêmeas e por ter ocorrido no sexto mês, podemos crer que possa ocorrer um efeito acumulativo da substância ou o envelhecimento orgânico pode afetar o metabolismo da bilirrubina direta. A hiperbilirrubinemia ocorre, sobretudo nas circunstâncias seguintes: lesão difusa do parênquima hepático (hepatite tóxica e infecciosa, cirrose), obstrução dos canais biliares e hemólise excessiva (LIMA et al., 1985). A bilirrubina é um pigmento de cor amarela com o máximo de absorção em 450 nm. Os carotenóides absorvem cerca do mesmo comprimento de onda, de modo que a ingestão de carotenóides pode limitar seriamente a medida espectrométrica direta da bilirrubina no soro.

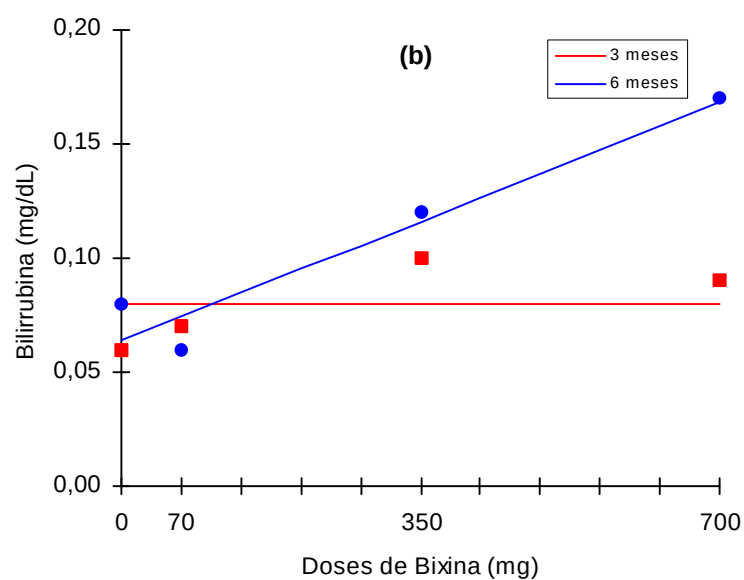
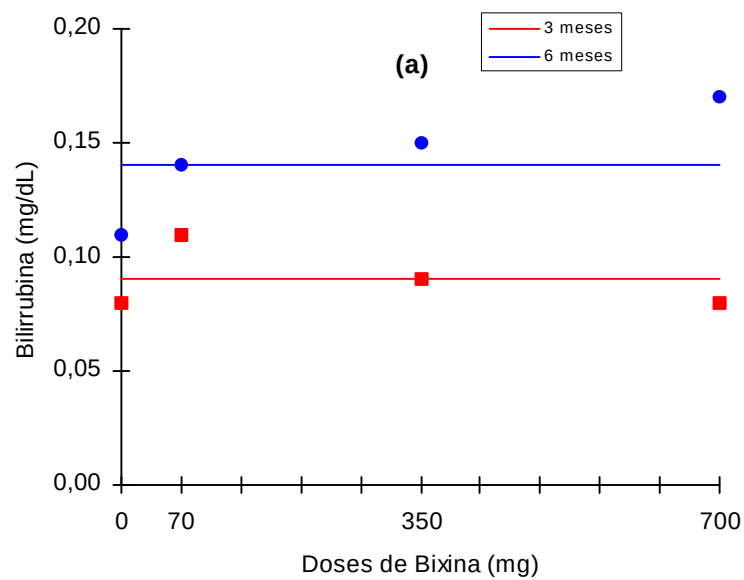


Figura 15 – Estimativas de bilirrubina direta de machos (a) e de fêmeas (b) de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina.

4.2.2.11. Proteínas

A concentração sérica de proteínas teve diferença significativa entre os sexos, somente nos grupos que não receberam bixina, portanto, tal diferença pode ser considerada fisiológica. Entretanto, os grupos que receberam diferentes doses de bixina (6^o mês), não apresentaram diferença significativa e com isso, acreditamos que possa ter ocorrido alguma interferência da substância estudada a ponto de anular tais diferenças. Quanto ao tempo, os únicos grupos que apresentaram diferenças significativas foram as fêmeas e machos que receberam 700 mg de bixina.

Os grupos que mais sofreram variação em relação ao controle pelo Teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade, foram o dos machos que receberam 350 mg (6^o mês) com um aumento de 11,68% e das fêmeas que não receberam bixina (6^o mês), com um aumento de 11,54% (Quadro 29).

Quadro 29 – Valores médios de proteína e percentual de variação em relação ao tratamento-controle, em machos e fêmeas de ratos tratados com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e aos 6 meses

Doses de Bixina (mg)	Tempo (meses)	Proteína (g/dL)		Variação em relação ao controle (%)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
0	3	60,80 Aa	64,10 Aa	-	-
	6	54,60 Ba	71,50 Aa	-10,20	+11,54
70	3	60,83 Aa	63,40 Aa	+0,05	-1,09
	6	64,38 Aa	64,28 Aa	+5,89	+0,28
350	3	62,33 Aa	63,50 Aa	+2,52	-0,94
	6	67,90 Aa	64,40 Aa	+11,68	+0,47
700	3	58,13 Ab	58,28 Ab	-4,39	-9,08
	6	66,25 Aa	67,98 Aa	+8,96	+6,05

Em cada dose de Bixina e cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

Em cada dose de Bixina e cada sexo, a difere de b pelo teste F (P<0,05).

* Estatisticamente diferente do controle (0 mg de bixina), pelo teste de Dunnett (P<0,05).

A dose que apresentou diferença significativa foi no grupo dos machos dosados no sexto mês (Quadro 30).

Quadro 30 – Equações ajustadas aos dados de proteína de machos e de fêmeas de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina (B)

Característica	Sexo	Tempo (meses)	Equação ajustada	R ²
Proteína	Machos	3	$\bar{Y} = 148,46$	-
		6	$\hat{Y} = 57,1760 + 0,05609 * B - 0,00006219 * B^2$	0,80
	Fêmeas	3	$\bar{Y} = 62,32$	-
		6	$\bar{Y} = 67,04$	-

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste t.

Pela Figura 16, podemos verificar o comportamento dos níveis de proteínas em relação às diferentes doses de bixina.

Podemos observar que em relação aos machos, os grupos dosados no terceiro mês não tiveram diferenças significativas entre si, mas, os dosados no sexto mês, apresentaram um aumento em todos os tratamentos em relação ao controle.

Em relação às fêmeas, não houve diferenças significativas em nenhum tempo de dosagem.

Os níveis aumentados de proteína sérica podem ser devido à hemoconcentração.

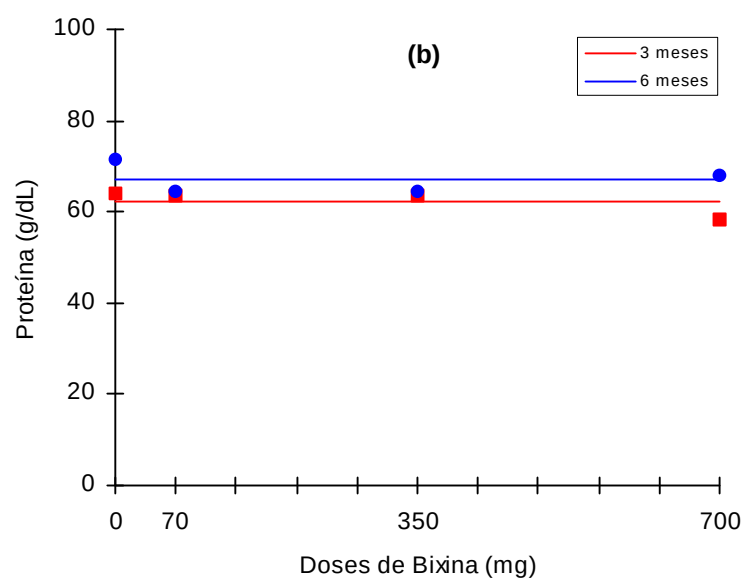
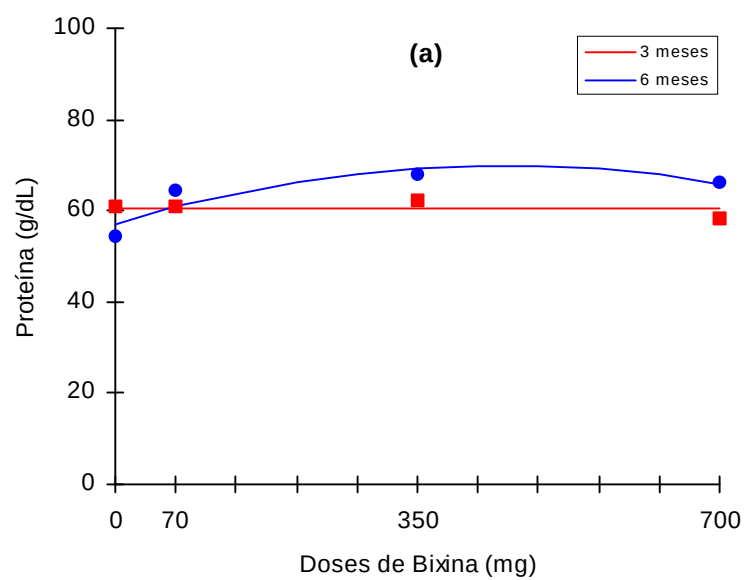


Figura 16 – Estimativas de proteína de machos (a) e de fêmeas (b) de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina.

4.2.2.12. Aspartato aminotransferase

No Quadro 31, podemos verificar que as diferenças significativas em relação ao sexo, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste F, ocorreram no grupo controle, dosado no terceiro e sexto mês, e no grupo que recebeu 700 mg de bixina (6^o mês).

Quadro 31 – Valores médios de aspartato aminotransferase e percentual de variação em relação ao tratamento-controle, em machos e fêmeas de ratos tratados com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e aos 6 meses

Doses de Bixina (mg)	Tempo (meses)	AST (UI)		Variação em relação ao controle (%)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
0	3	87,25 Ba	208,25 Aa	-	-
	6	87,75 Ba	216,00 Aa	+0,57	+3,72
70	3	98,00 Aa	93,50 Aa	+12,32	-55,10 *
	6	113,00 Aa	104,00 Aa	+29,51	-50,06 *
350	3	132,25 Aa	133,00 Aa	+51,58	-36,13
	6	107,50 Aa	70,50 Ab	+23,21	-66,15 *
700	3	106,75 Aa	140,50 Aa	+22,35	-32,53
	6	116,50 Ba	178,50 Aa	+33,52	-14,29

Em cada dose de Bixina e cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

Em cada dose de Bixina e cada sexo, a difere de b pelo teste F (P<0,05).

* Estatisticamente diferente do controle (0 mg de bixina), pelo teste de Dunnett (P<0,05).

Com isso podemos supor que tais diferenças não estão relacionadas à substância testada. Em relação ao tempo, houve diferença significativa apenas o grupo das fêmeas que receberam 350 mg de bixina.

A maior variação no grupo dos machos em relação ao controle ocorreu no grupo que recebeu 350 mg de bixina (3^o mês), onde houve um aumento de 51,58%. Entretanto, no grupo das fêmeas, o que mais variou foi o que recebeu 350 mg de bixina (6^o mês), com um decréscimo de 66,15% de sua concentração, sendo este significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett.

Os dados de AST, em relação às doses, são significativos apenas no grupo das fêmeas dosadas no sexto mês, onde se ajustou uma equação de regressão, no mesmo grupo dosado no terceiro mês houve diferença, mas não houve ajuste de uma equação de regressão (Quadro 32).

Quadro 32 – Equações ajustadas aos dados de Aspartato aminotransferase de machos e de fêmeas de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina (B)

Característica	Sexo	Tempo (meses)	Equação ajustada	R ²
AST	Machos	3	$\bar{Y} = 106,06$	-
		6	$\bar{Y} = 106,19$	-
	Fêmeas	3	Médias observadas	-
		6	$\hat{Y} = 188,7480 - 0,7433 B + 0,001047^{**} B^2$	0,82

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

A relação dos dados referentes à Aspartato aminotransferase e doses de bixina está apresentada na Figura 17.

Não houve diferença significativa entre tratamentos (3^o e 6^o mês) nos grupos dos machos, e também não houve diferença na concentração de AST no terceiro e sexto mês. Entretanto, as concentrações de AST estão muito elevadas, sendo que o normal é de 43-73 UI (CRISPENS Jr, 1975), e como também o grupo controle apresentou sua concentração aumentada podemos supor que a elevação da concentração de AST esteja ligada a algum fator comum aos quatro grupos.

Uma provável hipótese seria a contaminação da água ingerida pelos animais por cobre, que é um constituinte do acessório do bebedouro que tem contato direto com a boca do animal. Tal acessório apresentou ranhuras provocadas pelo atrito com os dentes dos animais, e em consequência grande quantidade de cobre pode ter sido ingerida pelos mesmos.

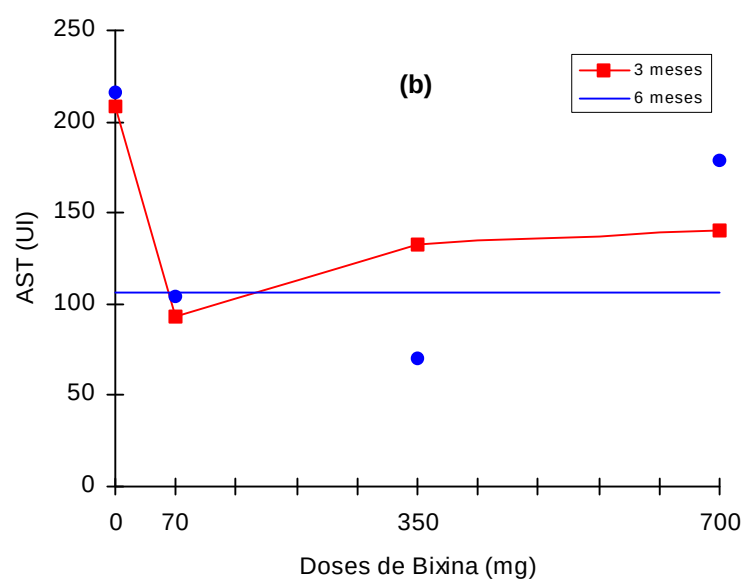
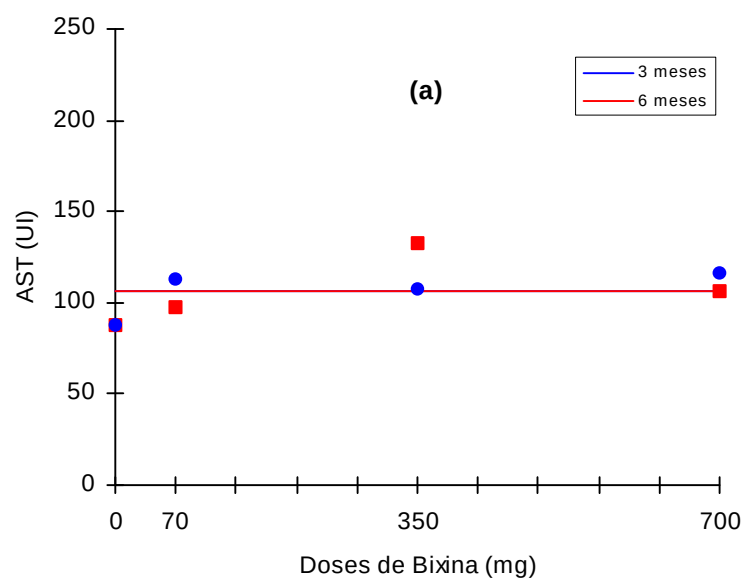


Figura 17 – Estimativas e valores médios da Aspartato aminotransferase (AST) de machos (a) e de fêmeas (b) de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina.

O que pode confirmar ainda mais esta hipótese é o fato de que além da água, os outros meios que poderiam levar a uma alteração hepática seriam a ração, que possui 26 µg/g de cobre e segundo ABURTO et al. (2001) é necessária uma dose maior que 1000 µg/g para que ocorra a lesão hepática. A ração também não possui outro constituinte que possa causar tal dano.

O desenvolvimento de uma hepatite virótica pode ser descartado devido ao fato de que a relação AST/ALT nos casos de hepatite virótica aguda é menor do que um e tal fato não ocorre no estudo em questão.

Segundo SCHEINBERG et al. (1977) a administração crônica de cobre em coelhos, ratos, macacos, porcos e bovinos levam à deposição do metal no fígado. As hidrolases ácidas são liberadas e levam à necrose dos hepatócitos e várias enzimas são liberadas, inclusive a AST e ALT.

Nos grupos das fêmeas, houve diferença entre o terceiro e o sexto mês. No terceiro mês a concentração de AST foi menor nos grupos que receberam a substância em relação ao controle, o que pode nos levar a supor que a bixina pode ter tido alguma ação na regeneração hepática. No sexto mês não houve diferença significativa entre os tratamentos.

REDDY & LOKESH (1996), em um estudo sobre o efeito da curcumina e do eugenol sobre os danos hepáticos induzidos através de injeção de 30 mg de Fe^{2+} em solução salina, demonstraram que as substâncias reduziram tais danos pela diminuição da peroxidação dos lipídios, verificado pela redução dos níveis de AST e ALT.

4.2.2.13. Alanina aminotransferase

Os machos e fêmeas diferiram entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste F, quanto à concentração de ALT, no grupo que recebeu 350 mg de bixina e no que recebeu 700 mg, ambos no sexto mês. Houve diferença significativa, quanto ao tempo, apenas no grupo das fêmeas que receberam 700 mg de bixina. Não houve diferença significativa nos grupos que receberam bixina em relação ao controle, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste de Dunnett. A maior variação dos machos e das fêmeas, foi um aumento de 58,06% e de 56,52%, respectivamente (Quadro 33).

Quadro 33 – Valores médios de alanina aminotransferase e percentual de variação em relação ao tratamento-controle (0 mg de bixina), em machos e fêmeas de ratos tratados com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e aos 6 meses

Doses de Bixina (mg)	Tempo (meses)	ALT (UI)		Variação em relação ao controle (%)	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
0	3	54,25 Aa	74,75 Aa	-	-
	6	59,25 Aa	83,25 Aa	+9,22	+11,37
70	3	79,25 Aa	57,25 Aa	+46,08	-23,41
	6	72,00 Aa	61,50 Aa	+32,72	-17,73
350	3	72,75 Aa	77,25 Aa	+34,10	+3,34
	6	85,75 Aa	50,25 Ba	+58,06	-32,78
700	3	75,00 Aa	66,25 Ab	+38,25	-11,37
	6	72,25 Ba	117,00 Aa	+33,18	+56,52

Em cada dose de Bixina e cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

Em cada dose de Bixina e cada sexo, a difere de b pelo teste F (P<0,05).

* Estatisticamente diferente do controle (0 mg de bixina), pelo teste de Dunnett (P<0,05).

Quanto às doses de bixina, houve diferença significativa apenas no grupo das fêmeas (6^o mês) (Quadro 34).

Quadro 34 – Equações ajustadas aos dados de Alanina aminotransferase de machos e de fêmeas de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina (B)

Característica	Sexo	Tempo (meses)	Equação ajustada	R ²
ALT	Machos	3	$\bar{Y} = 70,31$	-
		6	$\bar{Y} = 72,31$	-
	Fêmeas	3	$\bar{Y} = 68,88$	-
		6	$\bar{Y} = 80,1296 - 0,2328 * B + 0,0004086 ** B^2$	0,99

** e * Significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Na Figura 18 estão apresentados os gráficos dos dados de Alanina aminotransferase em função das doses de bixina.

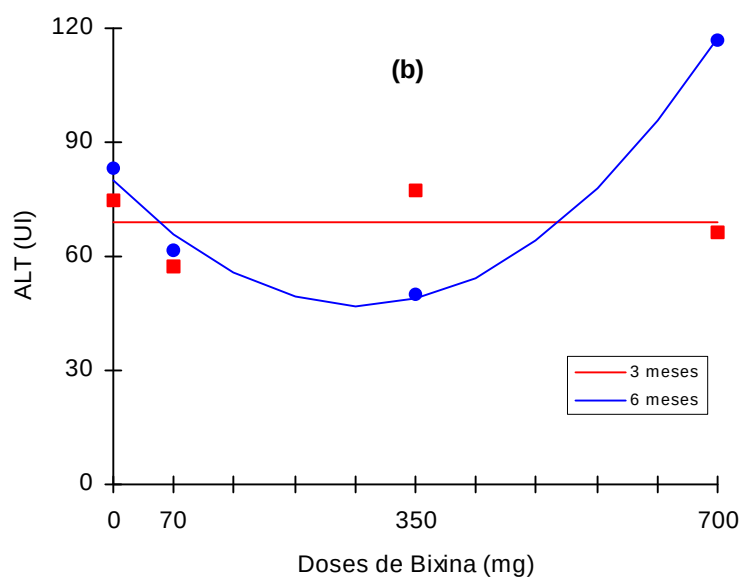
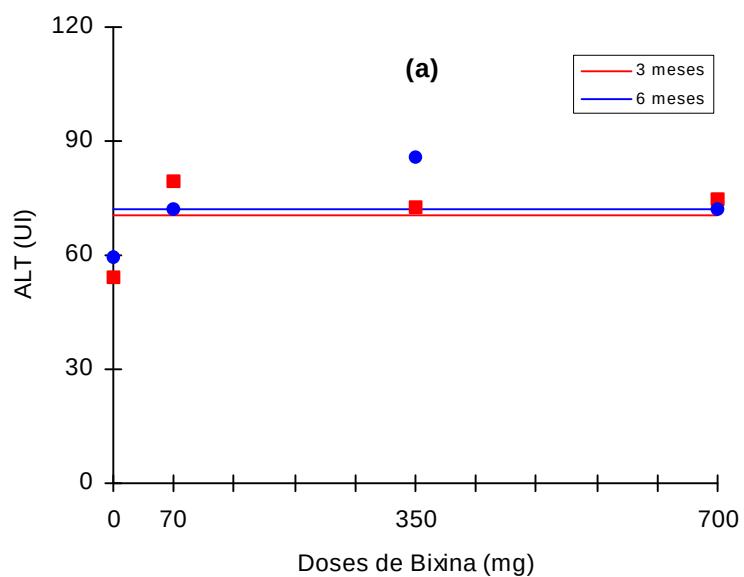


Figura 18 – Estimativas da Alanina aminotransferase (ALT) de machos (a) e de fêmeas (b) de ratos avaliados aos 3 e 6 meses, em função de doses de bixina.

Podemos verificar que os grupos dos machos que sofreram tratamento não diferiram do controle no terceiro e sexto mês, porém todos os grupos estão acima do normal pela literatura, o que pode ser devido à alta ingestão de cobre através da água. Quanto às fêmeas houve diferença em relação ao controle somente no terceiro mês, apresentando uma redução e um aumento no grupo que recebeu 700 mg de bixina, que pode ser devido à ação da bixina, e esta ação pode ter relação com o nível de bixina ingerida.

As doses utilizadas neste estudo foram altas se comparadas com as que normalmente usamos em nossa dieta. Em produtos de laticínios, utilizam-se cerca de 0,5 a 1% de extrato, com 20% de bixina. Então, se ingerirmos um copo de iogurte de 250 mL, estaremos ingerindo de 0,25 a 0,5 mg de bixina. Diante dos parâmetros bioquímicos analisados, a bixina pode ser mais explorada na indústria de alimentos sem que isto possa causar danos à saúde.

4.3. Segundo ensaio biológico – Tolerabilidade cutânea

No teste de tolerabilidade cutânea, comparando-se os sítios de aplicação da bixina com os sítios controles, pode-se verificar que não houve alterações cutâneas relativas a eritema, escaras e edema em nenhum dos tempos observados. Tais dados concordam com os obtidos por GERMANO et al. (1997) avaliaram uma possível resposta tópica ao extrato de urucum na pele de coelho em uma única aplicação, depois de repetidas aplicações e após exposição à luz ultravioleta. Estudos histológicos foram conduzidos para avaliar possíveis danos e penetração do corante na pele do coelho. O corante não provocou degeneração, concluindo-se que o corante tem boa tolerabilidade cutânea, podendo ser usado na comestologia.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo do estudo foi avaliar os níveis tóxicos de três doses de extrato que contém bixina (70, 350 e 700 mg), com base em ensaio toxicológico.

Foi conduzido um ensaio biológico, com 96 ratos (48 machos e 48 fêmeas) (*Rattus norvegicus*), variedade albinus, da raça Wistar, recém-desmamados, com 24 dias de idade. Os animais foram distribuídos em quatro grupos de 24, sendo que o grupo 1 recebeu somente ração, os outros três grupos receberam corante utilizado na indústria de alimentos que contém 28% de bixina; grupo 2 (70 mg) , o grupo 3 (350 mg) e o grupo 4 (700 mg).

O extrato foi caracterizado através da determinação dos teores de proteína (5,33%), cinzas (2,04%), umidade (5,49%), extrato etéreo (50,49%), pH (2,62%), ponto de fusão (180°), teor de bixina após 12 meses sob refrigeração (20,8%).

Do primeiro ensaio biológico, ou seja, o estudo toxicológico crônico, podemos concluir:

- A bixina tem efeito hipocolesterolêmico em fêmeas e reduziu os níveis de triacilglicerol em machos, em animais normais.
- A bixina pode ter causado alteração nos níveis séricos de fósforo, na relação Ca:P no grupo das fêmeas.
- A bixina mostrou-se capaz de auxiliar a regeneração das lesões hepáticas, como no caso da provável intoxicação por cobre, onde os níveis de AST e ALT foram reduzidos no grupo que recebeu a bixina.

Do segundo ensaio, onde foi feito o teste de tolerabilidade cutânea, podemos concluir que a bixina não apresenta nenhum risco quanto à irritação cutânea.

Com esses estudos podemos concluir que a substância não alterou os parâmetros bioquímicos analisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABURTO, E.M., CRIBB, A.E., FUENTEALBA, C.I., IKEDE, B.O., KIBENGE, F.S.B., MARKHAM, F. Morphological and biochemical assessment of the liver response to excess dietary copper in Fischer 344 rats. **Canadian Journal of Veterinary Research**, **65**(2): 97-103, 2001.
- ALCÂNTARA, H.R. **Toxicologia Clínica e Forense**, 2^a ed. Andrei, São Paulo, 1985. 427p.
- ALEXANDER, R.R.; GRIFFITHS, J.M; WILKINSON, M.L. **Basic Biochemical Methods**. New York, John Wiley & Sons, 1984, 241p.
- ANALISA, **Técnicas Analíticas**, 1999, 40p.
- ANGELUCCI, E. Corantes naturais versus corantes artificiais : vantagens e desvantagens. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, Campinas, 1989. **Resumo...**Campinas, ITAL, 1989. p. 8-10.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química dos alimentos – teoria e prática**. 2^a ed. Viçosa, MG: UFV, 1999. 418p.
- ARRINGTON, L. R. **Introductory Laboratory Animal Science- the breeding, care and management of experimental animals**. The Interstate, 1972, 203 p.
- BABU, P.S.S., SRINIVASAN, K. Hypolipidemic action of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in streptozotocin induceddiabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.166, p.169-175, 1997.
- BACILA, M. **Bioquímica Veterinária**. Varela, São Paulo, 1980, 197-211p.

- BAKER. K.R., MEYDANI, M. β -Carotene as an antioxidant in immunity and cancer. *Journal Optimal Nutrition*. v. 3, p. 39-50, 1993.
- BATLOUNI, M., RAMIRES, J.A.F. Importância do endotélio na doença arterial coronariana e na aterogênese. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.62, n.4, p.255-270, 1994.
- BAURNFEIND, J.C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. **J. Nutr.**, 119:112-115, 1989.
- BENDICH, A. Carotenoids and the immune response. **American Institute of Nutrition**, Simpósio. 1988, 112-115p.
- BENDICH, A. Recent advances in clinical research involving carotenoids. **Pure & Appl. Chem**, 66(5): 1017-1024p, 1994.
- BHAGAVAN, N.V. **Bioquímica**, Interamericana, Rio de Janeiro, 1977
- BIDLACK, W.R., OMAE, S.T., MESKIN, M.S., JAHNER, D. **Phytochemicals: A New Paradigm**. Lancaster Basel, Pennsylvania, 1998, p.179.
- BOBBIO, F.O., BOBBIO, P.A. **Química do Processamento de Alimentos**. 2^a ed. São Paulo: Varela, 1992a, 145p.
- BOBBIO, P. A. ,BOBBIO, F. O. **Introdução à Química de Alimentos**. 2^a ed. Varella. São Paulo, 1992b. 234p.
- BRADY, W.E., MARES-PERLMAN, J.A., BOWEN, P., STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M. Human serum carotenoid concentrations are related to physiologic and lifestyle factors. **J. Nutr.**, v.126, p.129-137, 1996.
- BRASIL. Resolução nº 34, de 09 de março de 2001. Normas reguladoras de emprego de aditivos para alimentos. **Diário Oficial da [República Federativa do Brasil]**, 12 de março de 2001.
- BRITO FILHO, D. **Toxicologia Humana e Geral**. 2^a ed. São Paulo: Atheneu, 1988, p3.
- BRITO, A.S. **Manual De Ensaio Toxicológicos *in vivo***. Campinas, Editora da UNICAMP, 1994, 122p.
- BRITTON, G. Carotenoids. In: CHARLWOOD, B. & BANTHORPE, D. **Methods in Plant Biochemistry**, London, Academic Press, 1991, v. 7. p. 473-518.
- BRITTON, G. Carotenoids. In: HENDRY, G.A.F., HOUGHTON, J.D. **Natural Food Colorants**. 2^a ed., Blackie Academic & Professional, Glasgow, 1996, 197-243p.
- BRITTON, G. Carotenoids. In: HENDRY, G.F. ed. **Natural Foods Colorants**, New York, Blackie, 1992. P. 141-148.

- BRODY, T. **Nutritional Biochemistry**. Academic Press, Londres, 1993, 658p.
- BURTON, G. W. Antioxidant action of carotenoids, **American Institute of Nutrition**, Simpósio. 1988, 109-111p.
- CARRAZA, F.R. Minerales in dietas latinoamericanas. **Arch. Latinoam. Nutr.**, **38**(3): 599-621, 1988.
- CARVALHO, L.S. **Distribuição qualitativa e quantitativa de carotenóides e seus metabólitos em tecidos oculares humanos**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 52p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- CARVALHO, P. R. N. Extração de corante de urucum. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, Campinas, 1989. **Resumo...**Campinas, ITAL, 1989. p. 74-77.
- CLYDESDALE, F.M. & FRANCIS, F.J. Pigments. In: FENNEMA, O.R., ed. **Principles of Food Science – Food Chemistry**. New York, Marcel Dekker, 1976. Pte.1, 417p.
- COLLINS, P. The role of annatto in food colouring. **Food Ingredients & Processing International**, Rickmansworth, Hertfordshire, UK: Turret Group plc. 1992. p. 23-27.
- CONSTANT, P.B.L. **Microencapsulamento de bixina: agentes encapsulantes, avaliação da qualidade e aplicações**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 136p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- CRISPENS Jr., C.G. **Handbook on the Laboratory Mouse**. Library of Congress, Illinois, 114-121p. 1975.
- DUNHAM, N.; ALLARD, K. R. A preliminary pharmacologic investigation of the roots of *Bixa orellana*. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, **49**(4): 218-219p., 1960.
- ENGELHARDT, J. ROED, B.L. e DIDRIKSEN, C. Annatto; the natural colour of choice in modern food industry. **Natcol - Quaterly Information Bulletin**. **2**: 4-10p, 1988.
- FAO, La contaminación de los alimentos, Programa Misto FAO/OMS de Vigilancia. Finalidades y esquema. **Aliment. Nutr.(FAO)**, 2-22p, 1995.
- FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants. In: **27th Report of The Joint FAO/WHO**. World health Organization, Geneva, 1983.
- FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants. In: **27th Report of The Joint FAO/WHO**. World health Organization, Geneva, 1982.

- FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. Acribia, Zaragoza, 1993, p. 1095.
- FONTANA, J.D., MENDES, S.V., PERSIKE, D.S., PERACETTA, L.F., PASSOS, M. Carotenóides – cores atraentes e ação biológica. **Biotecnologia – ciência & desenvolvimento**, n 13, 40 a 45p. 2000.
- FRANK, H.A., COGDELL, R.J. The photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis. In: YOUNG, A., BRITTON, G. **Carotenoids in Photosynthesis**. Chapman & Hall, Glasgow, 1993, 254-326.
- FREJAVILLE, J.P. **Manual de exames de laboratório – 500 exames: indicação técnica, interpretação e diagnóstico**. Atheneu, Rio de Janeiro, São Paulo. 1989, 701p.
- FREUND, P.R. Natural colors in cereal based products. **Cereal Foods World**, **30**(4): 271-273, 1985.
- FREUND, P.R., WASHAM, C.J. Natural color for use in food. **Cereal Foods World**, **33**(7): 570-574, 1988.
- FURR, H.C., CLARK, R.M. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids, **Nutrition Biochemistry**, **8**, 1997, 364-377p.
- GAVA, A.J. **Princípios de tecnologia de alimentos**, 7^a ed., Nobel, São Paulo, 1988, 284p.
- GERMANO, M. P.; PASQUALE, R.; RAPISARDA, A.; MONTELEONE, D.; KEITA, A.; SANOGO, R. Drugs used in Africa as dyes: I. Skin absorption and tolerability of *Bixa orellana* L. **Phytomedicine**, **4**(2):129-131, 1997.
- GHIRALDINI, E Corantes naturais mais comumente usados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, **2**(1): 83-87p, 1994.
- GHIRALDINI, E. Corantes naturais mais comumente usados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, **2**(1): 93-97, 1996.
- GHIRALDINI, E. Produção e comercialização interna de corantes naturais para alimentos. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, Campinas, 1989. **Resumo...**Campinas, ITAL, 1989. p. 21-25.
- GHIRALDINI, J. E. Mercado de corantes naturais. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, 2: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE URUCUM, 1, Campinas, 1991. **Resumo...**Campinas, ITAL, 1991. p. 79-83.
- GOUD, V.K., POLASA, K., KRISHNASWAMY, K. Effect of turmeric on xenobiotic metabolising enzymes, **Plant Food for Human Nutrition**, **44**: 87-92, 1993.

- GUIMARÃES, I. S. S. Corantes naturais: os sucedâneos dos artificiais. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, **2**(1): 88-99p, 1994.
- GUYTON, A.C. **Tratado de Fisiologia Médica**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 8^a ed., 1991, 864p.
- HALLAGAN, J.B. The use of certified food color additive in the United States, **Cereal Foods World**, **36**(11): 982, 1991.
- HARPER, H.A., RODWELL, V.W., MAYES, P.A. **Manual de Química Fisiológica**. 5^a ed. Atheneu, 736p. 1982.
- HASMEDA, M., POLYA, G.M. Inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by curcumin. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 599-605, 1995.
- HAVELAND-SMITH, R. B. Evaluation of the genotoxicity of some natural food colours using bacterial assays. **Mutation Research**, 91, 1981, 285-290p.
- HENDRY, B. S. Natural food colours. In: HENDRY, G.A.F., HOUGHTON, J.D. **Natural Food Colorants**. 2^a ed., Blackie Academic & Professional, Glasgow, 1996, 40-79p.
- KATO, O.R., OLIVEIRA, V.P., FARIA, L.J.G. Plantas corantes da Amazônia. In: FARIA, L.J.G., COSTA, C.M.L. **Tópicos especiais em tecnologia de produtos naturais**, p. 41-55, 1998.
- KHACHIK, F.; ASKIN, F.B.; LAI, K. Distribution, bioavailability, and metabolism of carotenoids in humans. In: Carotenoid-carotenoid interactions. In: BIDLACK, W.; OMAJE, S.T.; MESKIN, M.S.; JAHNER, D. **Phytochemicals - a new paradigm**. Technomic, 1998. 77-96p.
- KOHLMEIER, L., HASTING, S.B. Epidemiologic evidence of a role of carotenoids in cardiovascular disease prevention, **Am. J. Clin. Nutr.** **62** (supl): 1370S-1376S, 1995.
- KRINSKY, N.I. Carotenoids and cancer in animal models, **American Institute of Nutrition**, Simpósio. 1988, 123-126p.
- KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids, **Pure & Appl. Chem.**, **66**(5): 1003-1010p, 1994.
- KÜHN, H.A.; LASCH, H.G. **Avaliação Clínica e Funcional do Doente**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 291p. 1977.
- LASZLO, H., BASSO, L. M., COELHO, C. M. L. **Química de Alimentos**. Nobel, 1986. 99p.
- LAURO, G. J. **Handbook of Natural Color**. Ed. La Monde Ltda, Placentia, 31p. 1995.

- LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**, São Paulo, Sarvier, 1995, 839p.
- LIMA, A.O., SOARES, J.B., GRECO, J.B., GALIZZI, J, CANÇADO, J.R. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica – Técnica e Interpretação** 6^a ed. Guanabara Koogan, 1985.
- LIMA, L.R.P. **Efeito farmacológico, toxicológico e mecanismo de ação de flavonóides e corantes naturais extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) no metabolismo lipídico de coelhos**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 122p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- LUDUVING, M.M. Conheça os inimigos do colesterol. In: **Saúde! É vital**. São Paulo Azul, p.169, 1997.
- MAHFOUZ, M.M., KUMMEROW, F.A. Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. **Journal Nutrition Biochemical**, **11**: 293-302p, 2000.
- MANN, J. **Secondary Metabolism**, 2^a ed. Oxford Chemistry PressNova York, 1995, 374p.
- MARZZOCO, A., TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2^a ed., 1999, 360p.
- MASCARENHAS, J.M.O. **Corantes em alimentos: perspectivas, uso e restrições**. Viçosa, MG: UFV, 1998, 150p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- MATHEUS-ROTH, M.M. Recent progress in the medical applications of carotenoids. **Pure & Applied Chemistry**: **63**(1), 1991, 147-156p.
- MEGGOS, H. N. Colors - key food ingredients. **Food Technology**, 60-74p. 1984.
- MIDIO, A.F., MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**, Varela, São Paulo, 2000, 295p.
- MORRISON, E. Y. St. A.; SMITH-RICHARDSON, S.; BROOKS, S. E. H.; PASCOE, K.; FLETCHER, C. Toxicity of the hiperglycaemic-inducing extract of the annatto (*Bixa orellana*) in the dog. **West Indian Medical Journal**, **36**(2): 99-103p, 1987.
- MORRISON, E. Y. St. A.; WEST, M. E. The effect of *Bixa orellana* (annatto) on blood sugar levels in the anaesthetized dog. **West Indian Medical Journal**, **34**(1): 38-42p, 1985.
- MORTON, J. F. Can annatto (*Bixa orellana*) na old source of food color, meet new needs for safe dye? **Florida Sta. Hort. Soc. Proc.**, 73: 301-9, 1960.

- MOULIN, A.; TEISSERE, M.; BERNARD, C.; PIERONI, G. Lipases of the Euphorbiaceae family: purification of a lipase from Euphorbia characias latex and structure function relationships with the B. chain of ricin. **Proc. Natl. Acad. Sci.** Washington, USA, D.C.: National Academy of Sciences, v. 91, p.24, 1994.
- NAJAR, S.V., BOBBIO, F.O., BOBBIO, P.A. Effects of light, air, antioxidants and pro-oxidants on annatto extracts (*Bixa orellana*), **Food Chem.**, 29: 283-289, 1988.
- NAZÁRIO, G. Avaliação Toxicológica de Corantes Naturais. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, Campinas, 1989. **Resumo...**Campinas, ITAL, 1989. p. 2-6.
- NIELSEN, M. R. Natural colours for ice cream. **Rev. Scandinavian Dairy Information.** V 4, n. 4, 1990, p. 56-58.
- NISH, W. A.; WHISMAN, B. A.; GOETZ, D. W.; RAMIREZ, D. A. Anaphylaxis to annatto dye: a case report. **Annals of allergy**, 66(2): 129-131p, 1991.
- O'NEILL, M.E., THURNHAM, D.I. Intestinal absorption of β -carotene, lycopene and lutein in men and women following a standard meal: response curves in the triacylglycerol-rich lipoprotein fraction, **British Journal of Nutrition**, 79: 149-159, 1998.
- OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, Atheneu, São Paulo, 1996. 515p.
- OHASHI, E.Y.; FALESI, I.C.; EGASHIRA, Y. Urucu – uma opção para o estado do Pará. **Boletim Informativo**, nº 6, 1982. 3-13p.
- OLIVEIRA, T. T.; MASCARENHAS, J. M.; STRINGHETA, P. C.; QUEIROZ, M. E. L. R.; LIMA, L. R. P. Avaliação das concentrações dos minerais (Ca, Al, Pb, Co, Cu, Ni, Zn e Mn) em corantes naturais (urucum (norbixina), carmim, clorofila, cúrcuma, monascus, antocianina e vermelho de beterraba). SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS, 2, Campinas, 1997. **Resumos...**Campinas, UNICAMP, 1997.
- OLIVEIRA, V. P. Urucu - situação atual e perspectivas - região sul e sudeste. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, Campinas, 1989. **Resumo...**Campinas, ITAL, 1989. p. 55-58.
- OLIVEIRA, V.P. Melhoramento genético do urucuzeiro – uma visão do setor produtivo. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, 2(1): 1-6, 1996.
- OLSON, J.A. Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in humans. **Pure & Appl. Chem.** 66(5): 1011-1016p. 1994.
- ONG, D.E. Retinoid metabolism during intestinal absorption. **J.Nutr.**, 123:351-355, 1993.

- PALOZZA, P., KRINSKY, N.I. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 213, p. 403-420. 1992.
- PIRAGIBE, C. A. L. Estágio atual da classificação toxicológica dos corantes para uso alimentar. **Bol. SBCTA**, n. 24, dezembro, Campinas, SP, 134-146p, 1990.
- PRICE, J.F., SCHWEIGERT, B.S. **Ciencia de la carne y de los productos carnicos**, 2^a ed., Acribia, Zaragoza, 1994, p. 581.
- REDDY, A.C.; LOKESH, B.R. Effect of curcumin and eugenol on iron-induced hepatic toxicity in rats. **Toxicology**, 107 (1): 39-45, 1996.
- REDDY, S., AGGARWAL, B.B., Curcumin is a non-competitive and selective inhibitor of phosphorylase kinase. **FEBS Letters**, v.341, p.19-22, 1994.
- RIZZO, G. Opinião. **Alimentos e Tecnologia**, 10(65): 25, 1996.
- RODRIGUES, P. Alimentos. **Química e Derivados**, 30(33): 53, 1995.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Critical review of provitamin A determination in plant foods. **J. Micronutr. Anal.**, 5: 191-225, 1989.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Os carotenóides como precursores de vitamina A. **Bol. Soc. Bras. Ci. Tecnol. Alim.**, 19(4): 227-242, 1985.
- ROMANCHIK, J.E., HARRISON, E.H., MOREL, D.W. Addition of lutein, lycopene, or β -caroteno to LDL or serum in vitro: effects on carotenoids distribution, LDL composition, and LDL oxidation, **Nutrition Biochemistry**: 8, 1997, 681-688p.
- RUXTON, C. Antioxidant nutrients – do they have a protective role? **Food Chem. Toxic.** 32: (10), 1994, 995-1005p.
- SALGADO, P.E.T., FERNÍCOLA, N.A.G.G. **Noções Gerais de Toxicologia Ocupacional**, São Paulo, 1989. 146p.
- SAMBAIAH, K., RATANKUMAR, S., KAMANNA, V.S., SATYANARAYANA, M.N., RAO, M.V.L. Influence of turmeric and curcumin on growth, blood constituents and serum enzymes in rats. **Journal of Food Science and Technology**, v.19, p.187-190, 1982.
- SCHEINBERGH, H.,BUCK, W.B., CARTWRIGHT, G.E., DAVIS, G.K., DAWSON, C.R., MORGAN, J.M., NELSON, K.W., PRICE, C.A., STERNLIEB, I, BOAZ JR., T.D. **Copper - Medical and Biologic Effects of Environmental Polluants**. The National research Council, Washington, 1977, 115p.
- SCHMIDT, M. K., LABUZA, T. P. **Medical Foods**, **Food Tech.** 46(4): 87-96p. 1992.

- SCHULTES, R. E. Gifts of the Amazon flora to the world. **Arnoldia**, **50**(2): 21-34, 1990.
- SILVA, D.J. **Análise de alimentos – métodos químicos e biológicos**. Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1990, 165p.
- SMITH, E.L., HILL, R.L., LEHMAN, I.R., LEFKOWITZ, R.J., HANDLER, P., WHITE, A. **Bioquímica – Mamíferos**, 7^a ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1988, 620p.
- SOMMER, A. New imperatives for an old vitamina (A), **American Institute of Nutrition**, Simpósio. 1988, 96-100p.
- SPOON, W. Annatto, een tropische kleurstof voor voedingsmiddelen. **Technology Economical Sociale Geographical**, **51** (8): 225-226, 1960.
- SQUIBB, R.L.; GUSMAN, M. Carotene and riboflavin retention and serum vitamin levels in vitamin A depleted rats fed four forage meals, achiote meal, and african palm oil. **Turrialba**: **3**(3), 1953. 91-94p.
- SREEJAYAN, RAO, M.N.A. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. **Journal Pharm. Pharmacol.**, v.49, p.105-107, 1997.
- STAHL, W e SIES, H, NARAJA y SALUD, Ed. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados- Valência, Espanha, pág 61-68, 1996.
- SUBBA RAO, D., SEKHARA, N.C., SATYANARAYANA, M.N., SRINIVASAN, M. Effect of curcumin on serum and liver cholesterol levels in the rat. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 100, p. 1307-1316, 1970.
- SURESH BABU, P.S., SRINIVASAN, K. Hypolipidemic action of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in streptozotocin induced diabetic rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 166, p.169-175, 1997.
- TAIZ, L., ZEIGER, K. **Plant Physiology**. 2^a ed. Sunderland-Massachusetts, 1998, 792p.
- TAKAHASHI, M. Y. Especificações de corantes naturais usados em alimentos. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, Campinas, 1989. **Resumo...**Campinas, ITAL, 1989. p. 36-44.
- TAKAHASHI, M. Y. **Monografias De Corantes Naturais para Fins Alimentícios**, 2^a ed. São Paulo, Adolfo Lutz, 3-7p, 1987.
- TAYLOR, R. F. Production of natural carotenoids. In: NES, W.D., PARISH, E.J., TRZASKOS, J.M. **Regulation of Isopentenoid Metabolism**. ACS Symposium Series 497, Washington, 1992, 27-37p.
- TIMBERLAKE, C. F.; HENRY, B. S. Plant pigments as natural food colours. **Endeavour**, **10** (1): 31-6, 1986.

- UNNIKRISHNAN, M.B.S., RAO, M.N.A. Curcumin inhibits nitrate induced methaemoglobin formation. **FEBS Lett**, 301: 195-196, 1992.
- VALENTE, S.T.X. **Efeito de corantes naturais nos níveis de colesterol e triacilgliceróis séricos em ratos hiperlipidêmicos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 102p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- WHITE, W.S.; PAETAU, In. Carotenoid-carotenoid interactions. In: BIDLACK, W.; OMAE, S.T.; MESKIN, M.S.; JAHNER, D **Phytochemicals - a new paradigma**.. Technomic, 1998. 97-112p.
- WONG, D.W.S. **Química de los Alimentos – mecanismo y teoria**, Acríbia, Zaragoza, 476p, 1989.
- YABIKU, H. Y. Programa interlaboratorial de controle de qualidade - padronização de métodos de análise de teor de bixina em sementes de urucum. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, Campinas, 1989. **Resumo...**Campinas, ITAL, 1989. p. 79-86.
- ZHAO, W; HAN, Y.; ZHAO, B.; HIROTAS, S.; HOU, J.; XIN, W. Effects of carotenoids on the respiratory burst of rat peritoneal macrophages. **Biochim. Biophys Acta**, 1998. 1381: 1, 77-88.
- ZIEGLER, R.G. A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer, **American Institute of Nutrition**, Simpósio. 1988, 116-122p.

APÊNDICE

APÊNDICE

Quadro 1A – Resumo da análise de variância do colesterol total, triacilgliceróis, albumina, creatinina, uréia e glicose de machos e fêmeas de ratos submetidos a dietas com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e 6 meses

FV	GL	Quadrado médio					
		Colesterol total	Triacilgliceróis	Albumina	Creatinina	Uréia	Glicose
Tempo (T)	1	9.976,7590 **	1.641,2620 **	0,0256ns	0,3736 **	0,8010 ns	45.512,9000 **
Sexo (S)	1	3.613,9640 **	306,6876 *	0,6765 **	0,1048 **	629,0065 *	2.483,7790 ns
Bixina (B)	3	1.489,2920 *	199,9810 *	0,2511 *	0,0560 **	17,0826 ns	1.965,6130 ns
T x S	1	745,7684 ns	69,9315 ns	0,0452ns	0,0276 ns	41,5381 ns	5.751,3300 *
T x B	3	1.017,5410 ns	90,0531 ns	0,3499 *	0,0201 ns	278,7641 ns	2.252,4340 ns
S x B	3	863,8425 ns	25,4014 ns	0,1467ns	0,0466 *	608,6643 **	2.706,9230 ns
T x S x B	3	770,0132 ns	159,3876 *	0,0770ns	0,0184 ns	61,8231 ns	1.049,5530 ns
Resíduo	48	398,8547	56,2166	0,0895	0,0117	127,1973	1.343,2100
CV (%)		24,51	20,21	7,58	21,48	25,67	21,32

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 2A – Resumo da análise de variância da bilirrubina direta, proteína, AST, ALT, cálcio, fósforo e relação Ca:P de machos e fêmeas de ratos submetidos a dietas com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e 6 meses

FV	GL	Quadrado médio						
		Bilirrubina direta	Proteína	AST	ALT	Cálcio	Fósforo	Relação Ca:P
Tempo (T)	1	0,022877 **	223,8767**	8,2656ns	495,0625 ns	45,3602 **	1,4280 ns	0,82443**
Sexo (S)	1	0,007439 ns	123,4874 **	21.793,1400**	72,2500 ns	0,1406 ns	0,0289 ns	0,0071 ns
Bixina (B)	3	0,006618 *	11,9414ns	7.739,0160**	799,1667 ns	0,3179 ns	3,4458 *	0,0991 **
T x S	1	0,002377 ns	15,3077ns	11,3906 ns	203,0625 ns	15,9400 **	6,4009 *	0,0226 ns
T x B	3	0,004560 ns	52,2669ns	3.534,2240ns	732,0625 ns	1,7066 ns	1,3682 ns	0,0064 ns
S x B	3	0,003114 ns	99,8664*	16.998,9300**	1.740,4170 *	2,4412 ns	6,5835 **	0,0738 *
T x S x B	3	0,000243 ns	67,0481ns	761,5156 ns	1.467,8960ns	1,3442 ns	3,5671 *	0,0632 *
Resíduo	48	0,002270	28,5580	1.453,9530	580,1667	1,0591	1,1879	0,0192
CV (%)		46,00	8,44	30,61	33,28	10,27	13,04	11,39

** F significativo a 1% de probabilidade.
 * F significativo a 5% de probabilidade.
 ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 3A – Desdobramento de sexo dentro de tempos e de doses de bixina para o colesterol total, triacilgliceróis, albumina, creatinina, uréia e glicose de machos e fêmeas de ratos submetidos a dietas com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e 6 meses

FV	GL	Quadrado médio					
		Colesterol total	Triacilgliceróis	Albumina	Creatinina	Uréia	Glicose
Sexo/ bixina 0, 3 meses	1	4.507,7510**	19,5313 ns	0,1431ns	0,0153 ns	939,6112 **	8.160,0300 *
Sexo/ bixina 70, 3 meses	1	475,8613 ns	9,6800 ns	0,0045 ns	0,0018 ns	22,7813 ns	2.719,5310ns
Sexo/ bixina 350, 3 meses	1	2.460,5110 *	221,5512 ns	0,0903 ns	0,0128 ns	53,0450 ns	861,1253 ns
Sexo/ bixina 700, 3 meses	1	824,1799 ns	416,1613 **	0,0136 ns	0,0032 ns	3,5113 ns	34,8613 ns
Sexo/ bixina 0, 6 meses	1	451,5013 ns	3,9200 ns	1,0082 **	0,2145 **	1.538,4600**	1.860,5000ns
Sexo/ bixina 70, 6 meses	1	297,6801 ns	258,7813 *	0,0265 ns	0,0072 ns	57,2450 ns	339,3014 ns
Sexo/ bixina 350, 6 meses	1	203,3137 ns	0,0001 ns	0,0008 ns	0,0703 *	61,0512 ns	5.387,2200ns
Sexo/ bixina 700, 6 meses	1	40,5000 ns	1,3612 ns	0,1058 ns	0,0024 ns	6,3012 ns	141,9613 ns
Resíduo	48	398,8547	56,2166	0,0895	0,0117	127,1973	1.343,2100

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 4A – Desdobramento de sexo dentro de tempos e de doses de bixina para a bilirrubina direta, proteína, AST, ALT, cálcio, fósforo e relação Ca:P de machos e fêmeas de ratos submetidos a dietas com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e 6 meses

FV	GL	Quadrado médio						
		Bilirrubina direta	Proteína	AST	ALT	Cálcio	Fósforo	Relação Ca:P
Sexo/ bixina 0, 3 meses	1	0,000800ns	21,7800ns	29.282,0000**	840,5000 ns	0,6555 ns	0,2112 ns	0,0296 ns
Sexo/ bixina 70, 3 meses	1	0,003200ns	13,2613ns	40,5000 ns	968,0000 ns	0,0420 ns	1,3945 ns	0,0430 ns
Sexo/ bixina 350, 3 meses	1	0,000050 s	2,7612 ns	1,1250 ns	40,5000 ns	10,9278 **	3,0381 ns	0,0098 ns
Sexo/ bixina 700, 3 meses	1	0,000612ns	0,0450 ns	2.278,1250 ns	153,1250 ns	3,4453 ns	1,8336 ns	0,0009 ns
Sexo/ bixina 0, 6 meses	1	0,001513ns	571,2201**	32.896,1300**	1.152,0000ns	11,3050 **	8,0601 *	0,0023 ns
Sexo/ bixina 70, 6 meses	1	0,011250*	0,0200 ns	162,0000 ns	220,5000 ns	0,1860 ns	1,2800 ns	0,0515 ns
Sexo/ bixina 350, 6 meses	1	0,002450ns	24,5000 ns	2.738,0000 ns	2.520,5000 *	0,4656 ns	5,4121 *	0,1741 **
Sexo/ bixina 700, 6 meses	1	0,000013ns	5,9512 ns	7.688,0000 *	4.005,1250 *	0,4095 ns	15,6520 **	0,1296 *
Resíduo	48	0,002270	28,5580	1.453,9530	580,1667	1,0591	1,1879	0,0192

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 5A – Desdobramento de tempo dentro de sexo e de doses de bixina para o colesterol total, triacilgliceróis, albumina, creatinina, uréia e glicose de machos e fêmeas de ratos submetidos a dietas com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e 6 meses

FV	GL	Quadrado médio					
		Colesterol total	Triacilgliceróis	Albumina	Creatinina	Uréia	Glicose
Tempo/ bixina 0, machos	1	712,5313 ns	246,4201 *	0,5202 *	0,0084 ns	280,1345 ns	4.126,8610ns
Tempo/ bixina 70, machos	1	1.404,5000ns	14,8512 ns	0,0545 ns	0,1326 **	30,8112 ns	18.364,8600**
Tempo/ bixina 350, machos	1	3.095,6640**	806,0113 **	0,3240 ns	0,0406 ns	33,2113 ns	10.892,8800**
Tempo/ bixina 700, machos	1	3.608,2520 **	834,3612 **	0,0968 ns	0,0242 ns	249,7613 ns	10.989,0300**
Tempo/ bixina 0, fêmeas	1	368,5613 ns	86,4612 ns	0,0091 ns	0,0613 *	66,7013 ns	290,4051 ns
Tempo/ bixina 70, fêmeas	1	5.859,0300 **	235,4450 *	0,0190 ns	0,0561 *	46,0800 ns	4.218,2110 ns
Tempo/ bixina 350, fêmeas	1	411,8450 ns	182,4050 ns	0,0578 ns	0,1250 **	87,1200 ns	2,6450 ns
Tempo/ bixina 700, fêmeas	1	624,8115 ns	53,5613 ns	0,2701 ns	0,0684 *	270,2812 ns	12.285,2800**
Resíduo	48	398,8547	56,2166	0,0895	0,0117	127,1973	1.343,2100

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 6A – Desdobramento de tempo dentro de sexo e de doses de bixina para a bilirrubina direta, proteína, AST, ALT, cálcio, fósforo e relação Ca:P de machos e fêmeas de ratos submetidos a dietas com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e 6 meses

FV	GL	Quadrado médio						
		Bilirrubina direta	Proteína	AST	ALT	Cálcio	Fósforo	Relação Ca:P
Tempo/ bixina 0, machos	1	0,001250ns	76,8800ns	0,5000 ns	50,0000 ns	9,6141 **	0,1250 ns	0,1903 **
Tempo/ bixina 70, machos	1	0,001250ns	25,2050ns	450,0000 ns	105,1250 ns	9,7682 **	0,2278 ns	0,0853 *
Tempo/ bixina 350, machos	1	0,006613ns	62,1613ns	1.225,1250ns	338,0000 ns	25,3116 **	0,3362 ns	0,4317 **
Tempo/ bixina 700, machos	1	0,017113 **	132,0313*	190,1250 ns	15,1250 ns	15,3181 **	5,4946 *	0,0125 ns
Tempo/ bixina 0, fêmeas	1	0,000613ns	109,5200ns	120,1250 ns	144,5000ns	1,1476 ns	7,4691 *	0,0467 ns
Tempo/ bixina 70, fêmeas	1	0,000200ns	1,5312 ns	220,5000 ns	36,1250 ns	6,1952 *	0,1830 ns	0,0744 ns
Tempo/ bixina 350, fêmeas	1	0,000612ns	1,6200 ns	7.812,5000 *	1.458,0000ns	1,0878 ns	0,0001 ns	0,0198 ns
Tempo/ bixina 700, fêmeas	1	0,012013 *	188,1800 *	2.888,0000ns	5.151,1250**	2,0100 ns	8,7990 *	0,1952 **
Resíduo	48	0,002270	28,5580	1.453,9530	580,1667	1,0591	1,1879	0,0192

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 7A – Desdobramento de doses de bixina dentro de sexo e de tempo para o colesterol total, triacilgliceróis, albumina, creatinina, uréia e glicose de machos e fêmeas de ratos submetidos a dietas com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e 6 meses

FV	GL	Quadrado médio					
		Colesterol total	Triacilgliceróis	Albumina	Creatinina	Uréia	Glicose
Bixina/ machos, 3 meses	(3)	149,6030 ns	315,9371 **	0,0616 ns	0,0100 ns	35,8042 ns	1.819,7630 ns
Linear	1	46,7713 ns	803,5199 **	0,0342 ns	0,0217 ns	9,8402 ns	1.197,2420 ns
Quadrático	1	321,3276 ns	77,3861 ns	0,0032 ns	0,0080 ns	30,4381ns	1.722,0470 ns
Desvio	1	80,5101 ns	66,9053 ns	0,1474 ns	0,0002 ns	67,1343ns	2.540,0000 ns
Bixina/ fêmeas, 3 meses	(3)	3.667,4169 **	24,5377 ns	0,0375 ns	0,0325 ns	269,3552ns	2.759,8154 ns
Linear	1	12,0649 ns	26,9149 ns	0,0980 ns	0,0898 **	595,5100 *	2.186,6330 ns
Quadrático	1	338,0158 ns	38,6650 ns	0,0120 ns	0,0001 ns	29,2457 ns	367,5171 ns
Desvio	1	10.652,1700**	8,0331 ns	0,0025 ns	0,0076 ns	183,3098ns	5.725,2960 *
Bixina/ machos, 6 meses	(3)	286,1648 ns	100,8509 ns	0,6548 **	0,0654 **	486,1218 *	2.278,1832 ns
Linear	1	813,1611 ns	1,7445 ns	0,8039 **	0,0054 ns	574,1959 *	2.222,4110 ns
Quadrático	1	13,6010 ns	5,7435 ns	0,9102 **	0,0137 ns	173,7560 ns	4.367,2870 ns
Desvio	1	31,7323 ns	31,0648 *	0,2503 ns	0,1770 **	710,4136 *	244,8516 ns
Bixina/ fêmeas, 6 meses	(3)	36,9108 ns	33,4637 ns	0,0709 ns	0,0332 *	174,9676ns	1.116,1457 ns
Linear	1	0,1176 ns	96,5003 ns	0,1876 ns	0,0675 *	1,3504 ns	662,3716 ns
Quadrático	1	16,6677 ns	0,0086 ns	0,0193 ns	0,0127 ns	435,2200ns	2.611,5960 ns
Desvio	1	93,9471 ns	3,8821 ns	0,0057 ns	0,0195 ns	88,3324 ns	74,4695 ns
Resíduo	48	398,8547	56,2166	0,0895	0,0117	127,1973	1.343,2100

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 8A – Desdobramento de doses de bixina dentro de sexo e tempo para a bilirrubina direta, proteína, AST, ALT, fósforo e cálcio de machos e fêmeas de ratos submetidos a dietas com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e 6 meses

FV	GL	Quadrado médio						
		Bilirrubina direta	Proteína	AST	ALT	Cálcio	Fósforo	Relação Ca:P
Bixina/ machos, 3 meses	(3)	0,000973ns	12,2191ns	1.473,5561ns	487,6765 ns	2,2250 ns	1,4092 ns	0,0317 ns
Linear	1	0,000746ns	13,7523ns	1.086,1330ns	298,3226 ns	1,7884 ns	3,5401 ns	0,0145 ns
Quadrático	1	0,000650 ns	21,5928 ns	3.297,9640 ns	197,7470 ns	4,8752 *	0,0003 ns	0,0656 ns
Desvio	1	0,001523ns	1,3123 ns	36,5713 ns	966,9600 ns	0,0115 ns	0,6872 ns	0,0150 ns
Bixina/ fêmeas, 3 meses	(3)	0,001283ns	29,4516ns	9.080,7407 **	328,8702 ns	1,0338 ns	0,8732 ns	0,0584 *
Linear	1	0,002646ns	72,1873ns	1.219,7580ns	1,0323 ns	0,3187 ns	0,1725 ns	0,0251 ns
Quadrático	1	0,001202ns	13,9875ns	5.078,4240ns	105,5281 ns	0,0010 ns	2,3783 ns	0,0721 ns
Desvio	1	0,000002ns	2,1800 ns	20.944,0400**	880,0501 ns	2,7816 ns	0,0687 ns	0,0780 *
Bixina/ machos, 6 meses	(3)	0,002821ns	142,2684**	659,1687 ns	468,3915 ns	0,2764 ns	1,1969 ns	0,0227 ns
Linear	1	0,007026ns	187,2591 *	875,6290 ns	283,1653 ns	0,0163 ns	0,2886 ns	0,0126 ns
Quadrático	1	0,000583ns	154,8613 *	91,9181 ns	1.078,3500ns	0,2160 ns	3,1332 ns	0,0321 ns
Desvio	1	0,000854ns	84,6848 ns	1.009,9590 ns	43,6592 ns	0,5069 ns	0,1689 ns	0,0234 ns
Bixina/ fêmeas, 6 meses	(3)	0,009472 *	47,1709 ns	17.818,4081**	3.454,1897 **	2,2743 ns	11,4841 **	0,1298 **
Linear	1	0,026840 **	2,7891 ns	76,7903 ns	3.555,3260 *	2,9178 ns	3,5281 ns	0,1279 *
Quadrático	1	0,000232ns	79,4675 ns	43.899,3600**	6.683,8730 **	1,2533 ns	23,9907 **	0,2336 **
Desvio	1	0,001345ns	59,2562 ns	9.479,0740 *	123,3701 ns	2,6518 ns	6,9335 *	0,0279 ns
Resíduo	48	0,002270	28,5580	1.453,9530	580,1667	1,0591	1,1879	0,0192

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 9A – Significância da estatística F e coeficiente de variação experimental (CV) para constituintes sanguíneos de machos e fêmeas de ratos tratados com diferentes doses de bixina e avaliados aos 3 e aos 6 meses

Constituintes Sanguíneos	Fontes de variação							CV (%)
	T	S	B	T x S	T x B	S x B	T x S x B	
Colesterol total	**	**	*	ns	ns	ns	ns	24,51
Triacilgliceróis	**	*	*	**	ns	ns	*	20,21
Albumina	ns	**	*	ns	*	ns	ns	7,58
Creatinina	**	**	**	ns	ns	*	ns	21,48
Uréia	ns	*	ns	ns	ns	**	ns	25,67
Glicose	**	ns	ns	*	ns	ns	ns	21,32
Bilirrubina direta	**	ns	*	ns	ns	ns	ns	46,00
Proteína	**	**	ns	ns	ns	**	ns	8,44
AST	ns	**	**	ns	ns	*	ns	30,61
ALT	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	33,28
Cálcio	**	ns	ns	**	ns	ns	ns	10,27
Fósforo	ns	ns	*	*	ns	**	*	13,04
Relação Ca:P	**	ns	**	ns	ns	*	*	11,39

** Significativo pelo teste F ($P < 0,01$)

* Significativo pelo teste F ($P < 0,05$).

ns Não-significativo pelo teste F ($P > 0,05$).

T = tempo após a aplicação dos tratamentos; S = sexo e B = doses de Bixina.