

Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Jamile Magalhães Ferreira

Avaliação do potencial terapêutico e da toxicidade das sementes de *Bixa
orellana L.* no tratamento de dislipidemias

Fortaleza
2010



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Biotecnologia em Saúde

Jamile Magalhães Ferreira

Avaliação do potencial terapêutico e da toxicidade das sementes de *Bixa orellana* L. no tratamento de dislipidemias

Fortaleza
2010

JAMILE MAGALHÃES FERREIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO E DA TOXICIDADE DAS
SEMENTES DE *Bixa orellana* L. NO TRATAMENTO DE
DISLIPIDEMIAS

Tese submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação
de Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia –
RENORBIO, como requisito parcial para obtenção do título
de Doutor em Biotecnologia.

Orientador (a): Prof.^a Dra. Maria Goretti Rodrigues de
Queiroz.

FORTALEZA
2010

F439a Ferreira, Jamile Magalhães
Avaliação do potencial terapêutico e da toxicidade das sementes de *Bixa orellana* L. no tratamento de dislipidemias / Jamile Magalhães Ferreira. -- Fortaleza, 2010.
185 f. ;il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz
Área de concentração: Biotecnologia em Saúde
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Fortaleza, 2010.

1. Toxicologia. 2. *Bixa orellana* L. 3. Dislipidemias. I. Queiroz, Maria Goretti Rodrigues de (Orient.) II. Universidade Federal do Ceará -- Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título

CDD 660.6

JAMILE MAGALHÃES FERREIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO E DA TOXICIDADE DAS SEMENTES DE *Bixa orellana* L. NO TRATAMENTO DE DISLIPIDEMIAS

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: 04/08/2010

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof.^a Dra. Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Prof. Dr. René Duarte Martins
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof.^a Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof.^a Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira
Universidade Federal do Ceará – UFC

DEDICATÓRIA

À minha avó, minha mãe e aos meus familiares, pela torcida e apoio.

Ao Daniel Freire, por todo incentivo, apoio e colaboração ao longo desses anos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado forças para concluir essa jornada, mostrando-me quais os caminhos a serem seguidos e, principalmente, por ter me proporcionado a oportunidade de viver esse momento.

Em especial, à minha avó Mirilande Magalhães e minha mãe Jane Mary Magalhães, que sempre me incentivaram em cada etapa da minha vida. Obrigada, pelo apoio e ajuda em todos os momentos. Sem o carinho e a força de vocês, não seria possível chegar até aqui.

Ao Daniel Freire de Sousa, que não foi apenas um companheiro incondicional, como também um co-participante neste estudo. Obrigada pelo amor, carinho, incentivo, paciência, força e estímulo dados em todos os momentos dessa trajetória.

Aos meus irmãos, Rita Caroline Magalhães e João Pedro Magalhães que sempre estiveram ao meu lado.

À minha orientadora Professora Maria Goretti Rodrigues de Queiroz, meu eterno agradecimento pelos conhecimentos adquiridos, paciência e pelo incentivo, sem dúvida, suas palavras de otimismo foram essenciais para a conclusão dessa etapa. Obrigada, ainda, pela confiança em mim depositada para a realização desse doutorado.

Carinhosamente o meu agradecimento aos colegas do Laboratório de Bioquímica Clínica, dentre eles: Amanda Roque, Gervásio Alberto Araújo, Claudênio Diógenes, Cynara Cortez, Thamires Maria Fontenele, Mariana Brito, Paulo Arthur Mendonça, Antônio Carlos Vasconcelos, Thiago Melo, Nayane Bezerra, Karolline Oliveira, Hector Galdino, Liana Silveira, Juliana Sales, Renata Sampaio e Richard Cavalcante. Obrigada pela convivência, companheirismo e imenso auxílio, uma vez que cada um contribuiu ao seu modo, sendo a ajuda de vocês imprescindível para a conclusão desse trabalho.

Ao grande mestre, professor Célio Lima de Melo, que tive o prazer de conhecer e conviver mais intensamente durante o doutorado. Obrigada pelos conselhos, ensinamentos, amizade e as boas risadas que me proporcionou ao longo dessa caminhada.

À todos os funcionários e professores que fazem parte do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas bem como do Departamento de Farmácia que contribuíram para a formação do meu conhecimento.

Aos colegas de graduação pela convivência e amizade durante todo o curso.

Ao Professor Said Fonseca, pela amizade, paciência e, principalmente, pelas excelentes sugestões oferecidas durante a execução do trabalho. Agradeço, ainda, pela colaboração na preparação da suspensão e ração hipercalórica utilizada nesse trabalho.

Aos membros da banca pela disponibilidade em participar da avaliação desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Dalgimar Beserra de Menezes, pela imprescindível contribuição nas análises histopatológicas e nas publicações dos trabalhos científicos.

Aos secretários Karine Ribeiro e Paulo Wanderson do Programa de Pós Graduação da RENORBIO pela colaboração durante a realização desse trabalho.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), pelo apoio financeiro concedido.

Aos animais de experimentação utilizados neste trabalho, cujo sacrifício de suas vidas, espero não ter sido em vão.

Enfim, à todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste estudo.

"Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você.

Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu."

(Luiz Fernando Veríssimo)

RESUMO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO E DA TOXICIDADE DAS SEMENTES DE *Bixa orellana* L. NO TRATAMENTO DE DISLIPIDEMIAS. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Ceará – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO). Jamile Magalhães Ferreira, tese de doutorado em Biotecnologia, 2010. Orientadora: Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz.

As sementes de *Bixa orellana* têm sido amplamente empregadas na indústria alimentícia e cosmética, além de serem utilizadas pela população para tratar diversas patologias. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade e o potencial terapêutico da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) no tratamento de dislipidemias. Para a execução de todos os protocolos experimentais utilizou-se a SABO nas doses 200mg/kg (SABO 200), 400mg/kg (SABO 400) e 800mg/kg (SABO 800), com exceção do teste do *up-and-down* no qual as doses foram de 2000 e 5000mg/kg. A avaliação toxicológica de doses repetidas foi realizada mediante uma única administração diária, por via oral, durante 30 e 90 dias. O estudo do efeito da SABO sobre o metabolismo lipídico foi desenvolvido utilizando camundongos com dislipidemia induzida por triton WR-1339, etanol, dieta hipercalórica e poloxamer-407 (P-407). Esse último protocolo experimental de hiperlipidemia citado foi escolhido para analisar a atividade das frações hexânica (HX), clorofórmica (CLO), acetato de etila (AC) e n-butanólica (N-BUT) obtidas a partir da SABO. Além disso, tanto a SABO como a CLO foram estudadas no protocolo da dieta hipercalórica. Não foram visualizados sinais tóxicos com a SABO no teste do *up-and-down*. No protocolo de toxicidade de doses repetidas, a SABO promoveu alterações em alguns parâmetros bioquímicos como glicemia, níveis séricos de AST, ALT e fosfatase alcalina, entretanto não foi verificada alterações significantes no hemograma. O tratamento com SABO nas doses estudadas proporcionou uma redução significativa de triglicerídeos (TG) nas 24h e 48h, após a injeção intraperitoneal (i.p.) de triton 400mg/kg. A SABO nas doses de 400 e 800mg/kg reduziram os níveis séricos de TG dos animais com hipertrigliceridemia induzida por etanol 10% e 26%. No protocolo de dislipidemia induzida por poloxamer 407 1000mg/kg, o tratamento com SABO 200, SABO 400 e SABO 800 proporcionou uma diminuição relevante dos valores de TG no período de 24h, 48h e 72h. Ainda nesse último modelo experimental de hiperlipidemia, as partições HX, CLO, AC e N-BUT revelaram ter um efeito hipolipidêmico após 72h de experimentação. Em relação ao protocolo da dieta hipercalórica, verificou-se que a SABO em todas as doses testadas bem como a CLO 3 promoveram redução dos níveis de CT. Os níveis de AST elevaram-se nos grupos tratados com CLO 1, 2 e 3. Verificou-se que as sementes de *Bixa orellana*, na preparação avaliada no presente trabalho, aparentemente não possuem características tóxicas nos períodos estudados. Além disso, a SABO e sua partição clorofórmica, parecem possuir características hipolipidêmicas. Os resultados obtidos são promissores, sugerem potencialidades terapêuticas e segurança na aplicação dessa suspensão no tratamento de dislipidemias, entretanto, outros estudos pré-clínicos e clínicos com as sementes de *B. orellana* são necessários para sua real aplicabilidade terapêutica.

Palavras-chave: *Bixa orellana* L., dislipidemias, toxicologia

ABSTRACT

EVALUATION OF THE THERAPEUTICAL POTENTIAL AND TOXICITY OF THE *Bixa orellana* L. SEEDS IN THE TREATMENT OF DYSLIPIDEMIAS. Department of Clinical Analyses and Toxicology - Federal University of Ceará. Jamile Magalhães Ferreira, PhD thesis in Biotechnology, 2010. Advisor: Goretti Maria Rodrigues de Queiroz, PhD.

Bixa orellana seeds have been used widely in food and cosmetic industry, besides being used popularly to treat various pathological disorders. The aim of the present work was to evaluate the toxicity and the therapeutic potential of the aqueous suspension of *Bixa orellana* (ASBO) seeds in the treatment of dyslipidemia. For all experimental protocols, ASBO was utilized in the doses of 200mg/kg (ASBO 200), 400mg/kg (ASBO 400) and 800mg/kg (ASBO 800), save in the *up-and-down* test for which doses of 2000 and 5000mg/kg were used. Toxicological evaluation of repeated doses was carried out with a single daily oral administration during 30 and 90 days. Study of ASBO effect on the lipid metabolism was developed using mice with dyslipidemia induced by triton WR-1339, ethanol, hypercaloric diet and poloxamer-407 (P-407). This last hyperlipidemia protocol was chosen in order to analyze the hexanic (HX), chloroformic (CLO), ethil acetate (EA) and n-buthanolic (N-BUT) fractions obtained from ASBO. Moreover, ASBO and CLO were studied in a protocol of hypercaloric diet. Toxic signals were not noted in the *up-and-down* test after ASBO administration. In the repeated doses toxicity protocol ASBO determined alterations in some biochemical parameters such as glycemia, levels of AST, ALT and of alkaline phosphatase; however, statistically significant differences were not verified as to the hemogram of the groups studied. ASBO treatment in the doses studied promoted a significant reduction of triglycerides (TG) in 24h and 48h, after triton (400mg/kg) intraperitoneal injection. 400 and 800mg/kg ASBO reduced TG serum levels of animals with hypertriglyceridemia induced by 10% and 26% ethanol. In the poloxamer 407 (1000mg/kg) protocol the administration of 200 ASBO, 400 ASBO and 800 ASBO provoked relevant reduction of TG values in 24h, 48h and 72h. Still in the last hyperlipidemia experimental model, HX, CLO, EA and N-BUT fractions revealed to exert a hypolipidemic effect at 72h. In regard to the hypercaloric diet protocol, ASBO in all doses tested, as well as CLO 3 promoted a decrease in total cholesterol (TC) levels. AST levels were raised in CLO 1, 2 and 3. In conclusion, *Bixa orellana* seeds, in the preparation evaluated in the present work have not shown toxic characteristics, for the studied periods. Moreover, ASBO and its chloroformic fraction seem to possess hypolipidemic activities. The results are promising and suggest therapeutical potentialities as well as safety in the application of this suspension in the treatment of dyslipidemia; however other pre-clinical and clinical studies with *B. orellana* seeds are necessary to assess their real therapeutical applicability.

Key words: *Bixa orellana* L., dyslipidemia, toxicology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura das lipoproteínas.....	33
Figura 2. Sementes de <i>Bixa orellana</i> L.....	47
Figura 3. Folhas e flores da <i>Bixa orellana</i> L.	48
Figura 4. Método de obtenção das partições hexânica, clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica oriundas da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i>	58
Figura 5. Esquema do delineamento experimental do protocolo de dislipidemia induzida por Triton WR-1339	66
Figura 6. Esquema do delineamento experimental protocolo de dislipidemia induzida por etanol.	67
Figura 7. Esquema do delineamento experimental protocolo de dislipidemia induzida por Poloxamer-407	69
Figura 8. Esquema do delineamento experimental do protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta hipercalórica.....	70
Figura 9. Níveis plasmáticos de glicose após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) ou água potável (controle).....	76
Figura 10. Níveis plasmáticos de glicose após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) ou água potável (controle).....	77
Figura 11. Níveis plasmáticos de AST após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) ou água potável (controle).....	82
Figura 12. Níveis plasmáticos de AST após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) ou água potável (controle).....	82

Figura 13. Níveis plasmáticos de ALT após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) ou água potável (controle).....	83
Figura 14. Níveis plasmáticos de ALT após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) ou água potável (controle).....	83
Figura 15. Níveis plasmáticos de fosfatase alcalina após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) ou água potável (controle).....	84
Figura 16. Níveis plasmáticos de fosfatase alcalina após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) ou água potável (controle).	84
Figura 17. Massa corporal dos grupos experimentais, em gramas, após tratamento por 30 e 90 dias com suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) e água potável (controle).....	89
Figura 18. Consumo de água dos grupos experimentais, em mililitros, após tratamento por 30 e 90 dias com suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) e água potável (controle).	90
Figura 19. Consumo de ração dos grupos experimentais, em gramas, após tratamento por 30 e 90 dias com suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) e água potável (controle)	91
Figura 20. Microfotografia representativa no aumento de 200X do tecido muscular estriado cardíaco dos grupos controle (A), SABO 200 (B), SABO 400 (C) e SABO 800 (D).....	93
Figura 21. Microfotografia representativa no aumento de 400X do tecido muscular estriado cardíaco normal dos grupos controle (A), SABO 200 (B), SABO 400 (C) e SABO 800 (D)	93
Figura 22. Microfotografia representativa no aumento de 200X do tecido hepático dos grupos controle (A), SABO 200 (B), SABO 400 (C) e SABO 800 (D).....	94

Figura 23. Microfotografia representativa no aumento de 400X do tecido hepático dos grupos controle (A), SABO 200 (B), SABO 400 (C) e SABO 800 (D).....	94
Figura 24. Microfotografia representativa no aumento de 200X do tecido renal dos grupos controle (A), SABO 200 (B), SABO 400 (C) e SABO 800 (D).....	95
Figura 25. Microfotografia representativa no aumento de 400X do tecido renal dos grupos controle (A), SABO 200 (B), SABO 400 (C) e SABO 800 (D).....	95
Figura 26. Microfotografia representativa no aumento de 200X do tecido pulmonar dos grupos controle (A), SABO 200 (B), SABO 400 (C) e SABO 800 (D).....	96
Figura 27. Microfotografia representativa no aumento de 400X do tecido pulmonar dos grupos controle (A), SABO 200 (B), SABO 400 (C) e SABO 800 (D).....	96
Figura 28. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) após 24h (a) e 48h (b) da hipertrigliceridemia induzida por triton	98
Figura 29. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) após 24 h (a) e 48h (b) da hipercolesterolemia induzida por triton	101
Figura 30. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) na hipertrigliceridemia induzida por etanol 10% e 26%.....	103
Figura 31. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) na glicemia, após 24h (a), 48h (b) e 72h (c) da administração intraperitoneal de poloxamer.....	105
Figura 32. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) na hipertrigliceridemia, após 24 (a), 48 (b) e 72h (c) da administração intraperitoneal de poloxamer.....	108
Figura 33. Efeito da administração das partições obtidas da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) na hiperglicemia após 24(a), 48(b) e 72h(c) da administração intraperitoneal de poloxamer.....	110

Figura 34. Efeito da administração das partições obtidas da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) na hiperglicemia após 24(a), 48(b) e 72h(c) da administração intraperitoneal de poloxamer.....	113
Figura 35. Efeito da administração das partições obtidas da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) na hipertrigliceridemia, após 24(a), 48(b) e 72h(c) da administração intraperitoneal de poloxamer.....	116
Figura 36. Efeito da administração das partições obtidas da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) na hipercolesterolemia, após 24(a), 48(b) e 72h (c) da administração intraperitoneal de poloxamer.....	119
Figura 37. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (a) e sua partição clorofórmica (b) nos níveis de colesterol total no protocolo da dieta hipercalórica	122
Figura 38. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (a) e sua partição clorofórmica (b) nos níveis de triglicerídeos no protocolo da dieta hipercalórica	123
Figura 39. Efeito da administração da partição clorofórmica nos níveis de AST no protocolo da dieta hipercalórica	125

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Níveis plasmáticos de glicose, colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle).....**78**
- Tabela 2.** Níveis plasmáticos de glicose, colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle).....**78**
- Tabela 3.** Níveis plasmáticos de uréia, creatinina e ácido úrico após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle).....**79**
- Tabela 4.** Níveis plasmáticos de uréia, creatinina e ácido úrico após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle).....**79**
- Tabela 5.** Níveis plasmáticos de proteínas totais e albumina após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle).....**80**
- Tabela 6.** Níveis plasmáticos de proteínas totais e albumina após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle).....**80**
- Tabela 7.** Níveis plasmáticos de AST, ALT, fosfatase alcalina e amilase após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle)**85**
- Tabela 8.** Níveis plasmáticos de AST, ALT, fosfatase alcalina e amilase após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle)**85**

Tabela 9. Níveis plasmáticos de sódio, potássio e cloreto após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) ou água potável (controle).....	86
Tabela 10. Níveis plasmáticos de sódio, potássio e cloreto após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) ou água potável (controle).....	86
Tabela 11. Parâmetros hematológicos após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) ou água potável (controle).....	87
Tabela 12. Parâmetros hematológicos após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) ou água potável (controle).....	88
Tabela 13. Massa dos órgãos, em gramas, dos grupos controle, SABO 200, SABO 400 e SABO 800, após 90 dias de tratamento	92
Tabela 14. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) após 24h e 48h da hipertrigliceridemia induzida por triton	97
Tabela 15. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) após 24h e 48h da hipercolesterolemia induzida por triton	100
Tabela 16. Níveis plasmáticos de colesterol total e triglicérides dos grupos controle, etanol, SABO 200, SABO 400 e SABO 800, após hipertrigliceridemia induzida por etanol 10 e 26%.....	103
Tabela 17. Níveis plasmáticos de glicose dos grupos controle, P-407, Gemfibrozil, SABO 200, SABO 400 e SABO 800, após administração intraperitoneal de poloxamer-407	106
Tabela 18. Níveis plasmáticos de triglicérides dos grupos, controle, P-407, Gemfibrozil, SABO 200, SABO 400 e SABO 800, após administração intraperitoneal de poloxamer-407.....	107
Tabela 19. Níveis plasmáticos de colesterol total dos grupos, controle, P-407, Gemfibrozil, SABO 200, SABO 400 e SABO 800, após administração intraperitoneal de poloxamer-407	109

Tabela 20. Níveis plasmáticos amilase dos grupos controle, P-407, Gemfibrozil, SABO 200, SABO 400 e SABO 800, após administração intraperitoneal de poloxamer-407	111
Tabela 21. Níveis plasmáticos lípase dos grupos controle, P-407, Gemfibrozil, SABO 200, SABO 400 e SABO 800, após administração intraperitoneal de poloxamer-407	112
Tabela 22. Níveis plasmáticos de glicose dos grupos tratados com salina (grupos controle e P-407), veículo ou partições (n-butanol, acetato, clorofórmio, hexano) após administração intraperitoneal de poloxamer-407	114
Tabela 23. Níveis plasmáticos de triglicerídeos dos grupos tratados com salina (grupos controle e P-407), veículo ou partições (n-butanol, acetato, clorofórmio, hexano) após administração intraperitoneal de poloxamer-407	117
Tabela 24. Níveis plasmáticos de colesterol total dos grupos tratados com salina (grupos controle e P-407), veículo ou partições (n-butanol, acetato, clorofórmio, hexano) após administração intraperitoneal de poloxamer-407	118
Tabela 25. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> e sua partição clorofórmica nos níveis plasmáticos de glicose, colesterol total e triglicerídeos no protocolo da dieta hipercalórica.....	124
Tabela 26. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> e sua partição clorofórmica na função renal hepática e pancreática no protocolo da dieta hipercalórica	126

LISTA DE ABREVIATURAS

AC – partição acetato de etila

ALT – alanina aminotransferase

ANOVA – análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Apo – apolipoproteína

ASBO – aqueous suspension of *Bixa orellana*

AST – aspartato aminotransferase

CEPA - Comitê de Ética em Pesquisa com Animais

CEPT – proteína de transferência de ésteres de colesterol

CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média

c-HDL – colesterol HDL

CLO – partição clorofórmica

CT – colesterol total

DAC – doença arterial coronariana

DCVs – doenças cardiovasculares

DL₅₀ – dose letal mínima para matar 50% da população

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético sódico

EPM – erro padrão da média

EUA – Estados Unidos da América

FAO/WHO - Food and Agriculture Organization/World Health Organization

GM/MS – Gabinete do Ministro/ Ministério da Saúde

HCM - hemoglobina corpuscular média

HDL - lipoproteína de alta densidade

HE – coloração hematoxilina-eosina

HMG-CoA redutase = 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA redutase
HX – partição hexânica

IDL - lipoproteínas de densidade intermediária

LACT - Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas

LCAT – lecitina colesterol aciltransferase

LDL - lipoproteína de densidade baixa

LPL – lipoproteína lípase

NAD – nicotinamida adenina nucleotídeo oxidado

NADH - nicotinamida adenina nucleotídeo reduzido

N-BUT - partição n-butanólica

OECD = Organisation for Economic Co-operation and Development

OMS – Organização Mundial de Saúde

P-407 – poloxamer 407

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

q.s.p. – quantidade suficiente para

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RE – Resolução Especial

RH – ração hipercalórica

RP - ração padrão

r.p.m. – rotações por minuto

SABO – suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana*

SABO 200 = suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* na dose de 200mg/kg.

SABO 400 = suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* na dose de 400mg/kg.

SABO 800 = suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* na dose de 800mg/kg.

SUS – Sistema Único de Saúde

SV - sinvastatina

TG – triglicerídeos

Triton WR-1339 – tiloxapol

U/L – unidades internacionais por litro

UECE – Universidade Estadual do Ceará

UFC – Universidade Federal do Ceará

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

VC - veículo

VCM - volume corpuscular médio

VLDL - lipoproteínas de densidade muito baixa

SUMÁRIO

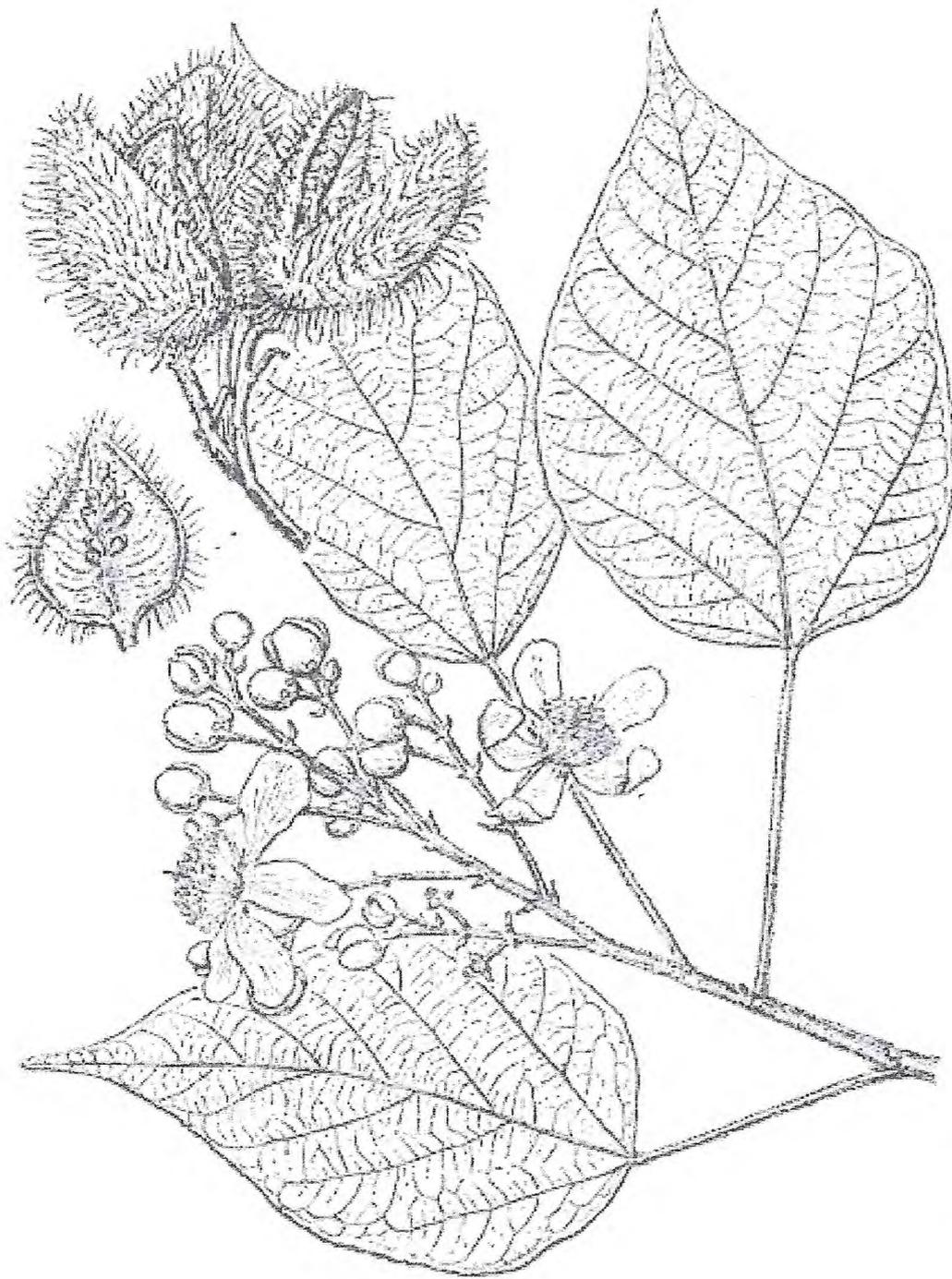
1	INTRODUÇÃO.....	27
1.1	Considerações gerais	27
1.2	Fitoterapia	29
1.3	Metabolismo Lipídico	32
1.3.1	Apolipoproteínas.....	33
1.3.2	Lipoproteínas	34
1.3.3	Dislipidemias.....	36
1.4	Plantas medicinais como recurso terapêutico.....	39
1.5	Investigação toxicológica de produtos naturais.....	41
1.6	Corantes naturais.....	45
1.7	<i>Bixa orellana L.</i> e suas potencialidades terapêuticas.....	47
2	OBJETIVOS	54
2.1	Objetivo geral.....	54
2.2	Objetivos específicos	54
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1	Preparação da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i>	57
3.2	Obtenção das partições oriundas da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i>	57
3.2.1	Obtenção da fração hexânica	59
3.2.2	Obtenção da fração clorofórmica	59
3.2.3	Obtenção da fração acetato	60
3.2.4	Obtenção da fração n-butanólica	60

3.3	Doses da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> e frações obtidas.....	61
3.3.1	Dispersão das partições em veículo	62
3.4	Drogas e reagentes utilizados	62
3.5	Animais experimentais	62
3.6	Protocolos experimentais	63
3.6.1	Avaliação da toxicidade oral aguda pelo teste do <i>Up-and-Down</i> em camundongos.....	63
3.6.2	Avaliação da toxicidade oral com doses repetidas (30 e 90 dias) da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> em ratos	64
3.6.3	Avaliação da atividade hipolipidêmica da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> em camundongos com dislipidemia induzida por triton WR-1339 (tiloxapol)	65
3.6.4	Avaliação da atividade hipotrigliceridemiante da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> em camundongos tratados com etanol	66
3.6.5	Avaliação da atividade hipolipidêmica da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> e de suas partições em camundongos com dislipidemia induzida por poloxamer-407	68
3.6.6	Avaliação da atividade hipocolesterolêmica da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> e sua partição clorofórmica em camundongos com hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.....	69
3.7	Obtenção das amostras	71
3.8	Procedimentos analíticos	71
3.9	Retirada dos órgãos e análise histológica	72
3.10	Análises estatísticas.....	73
3.11	Aprovação no Comitê de Ética.....	73

4	RESULTADOS	75
4.1	Protocolo de toxicidade oral pelo teste do <i>Up-and-Down</i>	75
4.2	Protocolos de toxicidade oral de doses repetidas por 30 dias e 90 dias.....	75
4.2.1	Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	75
4.2.2	Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	87
4.2.3	Medição e análise da massa corporal, massa dos órgãos, ingestão de ração e água	89
4.2.3.1	Avaliação da massa corporal.....	89
4.2.3.2	Avaliação da ingestão de água e ração.....	90
4.2.3.3	Avaliação da massa dos órgãos.....	91
4.2.4	Análise histológica dos órgãos.....	92
4.3	Protocolo de dislipidemia induzida por Triton WR-1339.....	97
4.3.1	Efeito da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) sobre os níveis plasmáticos de triglicerídeos em camundongos tratados com Triton WR-1339 (tyloxapol).....	97
4.3.2	Efeito da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) sobre os níveis plasmáticos de colesterol total em camundongos tratados com Triton WR 1339 (tyloxapol).....	99
4.4	Protocolo de dislipidemia induzida por etanol.....	102
4.4.1	Efeito da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) sobre os níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol total em camundongos tratados com etanol	102
4.5	Protocolo de dislipidemia induzida por Poloxamer-407.....	104
4.5.1	Efeito da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) sobre os níveis plasmáticos de glicose em camundongos tratados com poloxamer-407.....	104

4.5.2	Efeito da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) sobre os níveis plasmáticos de triglicérides em camundongos tratados poloxamer-407	106
4.5.3	Efeito da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) sobre os níveis plasmáticos de colesterol total em camundongos tratados poloxamer-407	109
4.5.4	Efeito da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) sobre os níveis plasmáticos de amilase e lipase em camundongos tratados poloxamer-407	111
4.5.5	Efeito das partições n-butanólica (N-BUT), acetato (AC), clorofórmica (CLO) e hexânica (HX) obtidas a partir da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) sobre os níveis plasmáticos de glicose em camundongos tratados poloxamer-407	112
4.5.6	Efeito das partições n-butanólica (N-BUT), acetato (AC), clorofórmica (CLO) e hexânica (HX) obtidas a partir da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) sobre os níveis plasmáticos de triglicérides em camundongos tratados poloxamer-407.....	115
4.5.7	Efeito das partições n-butanólica (N-BUT), acetato (AC), clorofórmica (CLO) e hexânica (HX) obtidas a partir da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> (SABO) sobre os níveis plasmáticos de colesterol total em camundongos tratados poloxamer-407	117
4.6	Protocolo de dislipidemia induzida por dieta hipercalórica.....	120
4.6.1	Efeito da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> e sua partição clorofórmica sob o metabolismo lipídico e glicêmico em camundongos com hipercolesterolemia induzida por ração hipercalórica	120
4.6.2	Efeito da suspensão aquosa das sementes de <i>Bixa orellana</i> e sua partição clorofórmica sob a função renal, hepática e pancreática em camundongos com hipercolesterolemia induzida por ração hipercalórica	124
5	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	128

6 CONCLUSÃO	150
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152
ANEXOS	172
Anexo 1.....	172
Anexo 2.....	173
Anexo 3.....	180
Anexo 4.....	181



**I
N
T
R
O
D
U
Ç
Ã
O**

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Temas como biodiversidade, plantas medicinais e desenvolvimento de novos medicamentos são amplamente discutidos nos meios de comunicação, em virtude de sua relevância e do seu caráter estratégico, especialmente em países considerados emergentes como o Brasil. A potencialidade das plantas nativas para o desenvolvimento de fármacos e matérias-primas farmacêuticas, fundamenta-se no tripé biodiversidade, aceitabilidade e mercado econômico (HEINZMANN & BARROS, 2007).

O Brasil é um dos países com maior diversidade, concorrendo com a Indonésia pelo título de nação biologicamente mais rica do planeta (MITTERMEIER *et. al.*, 2005). Estima-se que em nosso território exista mais de 56.000 espécies vegetais catalogadas, o equivalente a 19% da flora mundial (GIULIETTI *et. al.*, 2005). Entretanto, é preciso destacar, que a biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão, tal a sua complexidade, uma vez que o país é detentor da maior diversidade genética vegetal do planeta (SIMÕES & SCHENKEL, 2002). Além desse acervo genético, é importante ressaltar que a riqueza cultural e étnica resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto conhecimento sobre manejo e uso de plantas medicinais (BRASIL, 2006c).

A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas ocorre desde tempos imemoriais, sendo, talvez, uma das primeiras formas de utilização das plantas e dos produtos naturais. A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. A busca incessante pela compreensão das leis naturais e o desafio de transpor barreiras à sua sobrevivência, como o clima e as doenças,

levaram o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico (JÚNIOR *et. al.*, 2006).

Assim, as observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos, com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (MACIEL *et. al.*, 2002).

Neste sentido, verifica-se que o Brasil possui os requisitos necessários para estabelecer um modelo de desenvolvimento voltado para a utilização de plantas medicinais, proporcionando o uso sustentável dos componentes da biodiversidade, além de promover a geração de riquezas com inclusão social (BRASIL, 2006c).

É fato, que muitas plantas ainda não possuem sua eficácia terapêutica comprovada, mas o conhecimento tradicional sobre as mesmas já as tornou parte integrante da prática médica popular, sendo utilizadas por até 90% da população economicamente carente do Nordeste para a solução de problemas de saúde (MATOS, 2002; SILVA *et. al.*, 2006). Segundo Matos (2002), a planta medicinal, quando usada corretamente, só difere do medicamento industrializado pela embalagem e pelas substâncias secundárias que acompanham o princípio ativo.

Combinando-se as informações populares sobre a flora medicinal, adquiridas junto às comunidades e especialistas tradicionais, aos estudos químicos/farmacológicos, podem ser formuladas hipóteses quanto à atividade farmacológica e à substância ativa responsável pelas ações terapêuticas relatadas ou atribuídas a determinada planta (SILVA *et. al.*, 2006). Baseado nessa afirmativa, pode-se inferir que o uso tradicional de espécies vegetais deve ser encarado como uma triagem quanto à utilidade terapêutica em humanos, não desconsiderando a possível toxicidade dessas plantas (ELISABETSKY, 2007).

Elisabetsky (2007) define etnofarmacologia como o ramo da etnobiologia que trata das práticas médicas, especialmente remédios, usados em sistemas tradicionais de medicina, cuja definição mais aceita é a “exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem”.

Nesse contexto, servindo de mediadora entre culturas diversas, a abordagem etnofarmacológica como estratégia na investigação de plantas medicinais tem se mostrado de grande eficácia para a descoberta de novos fármacos (SILVA *et. al.*, 2006).

Entretanto, após décadas de estudo, pode-se dizer que ainda não houve um processo coordenado de todos os atores (indústria, farmacologistas, fitoquímicos, químicos de síntese, toxicologistas, investigadores clínicos, entre outros) visando o desenvolvimento de drogas. Permanece, então, até hoje, a questão:

“Até quando um país com rica biodiversidade como o Brasil continuará deixando de explorar este potencial para a descoberta de novos fármacos”?

(FERREIRA, 1998)

É, portanto, indispensável continuar o processo de formação de recursos humanos e lutar pelo estabelecimento de programas direcionados para a investigação científica e tecnológica na área, buscando soluções na privilegiada biodiversidade brasileira, através da descoberta e desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica, ou no desenvolvimento de fitoterápicos genuinamente nacionais, com suas potencialidades terapêuticas e toxicidade bem conhecidas (SIMÕES & SCHENKEL, 2002).

1.2 FITOTERAPIA

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada nº 48/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fitoterápicos são medicamentos

preparados exclusivamente com plantas medicinais ou partes dessas (raízes, cascas, folhas, frutos ou sementes) que possuem propriedades reconhecidas de cura, prevenção, diagnóstico ou tratamento sintomático de doenças (ARNOUS, 2005). Podem ser constituídos de misturas complexas de uma ou mais plantas, excipientes, solventes, diluentes ou conservantes. Entretanto, é importante ressaltar que não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (CARVALHO *et.al.*, 2007; TUROLLA, 2004).

Entre as principais características dos medicamentos obtidos a partir de fontes naturais está a presença de uma grande variedade de princípios ativos e outras substâncias numa mesma planta. Contudo, tem se observado que os efeitos terapêuticos, muitas vezes, são provenientes da ação sinérgica destas substâncias ativas, e não das substâncias isoladas (TUROLLA, 2004).

Com base nos conhecimentos adquiridos sobre os produtos naturais durante milhares de anos e repassados de geração em geração pelos benzedores, curandeiros, magos e feiticeiros, os laboratórios científicos passaram a avaliar experimentalmente a veracidade dessas informações, tendo em vista a descoberta de novos medicamentos e fitoterápicos (DI STASI, 1996).

Aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica contemporânea advêm, direta ou indiretamente, de plantas medicinais, que se constituem atualmente como uma importante fonte para obtenção de produtos farmacêuticos (CARVALHO *et.al.*, 2007)

O uso de fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou com fins de diagnóstico passou a ser oficialmente reconhecido pela OMS (Organização Mundial de Saúde) em 1978, quando se recomendou a difusão mundial dos conhecimentos necessários para seu uso. Dessa forma, as práticas da medicina tradicional expandiram-se globalmente na última década do século passado, ganhando bastante popularidade (RODRIGUES *et. al.*, 2006).

Possivelmente, problemas econômicos, inexistência de estudos organizados e integrados para exploração desse manancial de riquezas biológicas, não permitiram, até o momento, a transposição de grande parcela das nossas espécies vegetais medicinais ao conceito de fitoterápicos (RODRIGUES *et. al.*, 2006).

Entretanto, nos últimos anos tem sido constatado um estímulo por parte do Ministério da Saúde, que mediante a publicação de uma portaria aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), objetivando a implementação de ações e serviços relativos a práticas medicinais alternativas, entre elas a fitoterapia (BRASIL, 2006a). O decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, fortalece e amplia as ações voltadas ao setor, constituindo-se num marco regulatório histórico. Como objetivo geral, esta política visa garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo a utilização sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006b).

A viabilização e concretização da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos pode ser comprovada com a divulgação de um documento no qual consta o nome de 71 plantas medicinais de interesse para o SUS (BRASIL, 2009). O objetivo principal é orientar e estimular estudos científicos nessa área a fim de viabilizar a elaboração de uma lista de plantas medicinais e fitoterápicos a serem disponibilizados para o uso da população de forma segura e eficaz para o tratamento de determinada doença. Além disso, em 20 de abril de 2010 foi publicada, no Diário Oficial da União, a Portaria nº 886/GM/MS (Gabinete do Ministro/Ministério da Saúde) que institui a Farmácia Viva no âmbito do SUS, o que indica os esforços empregados pelo Ministério da Saúde para ampliar as opções terapêuticas (BRASIL, 2010).

Diante desse cenário nacional, o atual aumento da capacitação, nas universidades e nos centros de pesquisa, proporciona a possibilidade de

desenvolvimento de fitoterápicos nacionais para uso nos programas de saúde pública, impondo a necessidade de uma integração entre os pesquisadores, as instituições e o seguimento industrial (RODRIGUES *et.al.*, 2006).

É importante salientar que o objetivo da implementação dos fitoterápicos não é de substituir medicamentos registrados e comercializados pelos laboratórios, mas sim, atuar como uma opção terapêutica à disposição dos profissionais da saúde (SILVA *et. al.*, 2008) para o tratamento de várias patologias, destacando-se aqui as doenças cardiovasculares cujo desenvolvimento está intimamente relacionado com o metabolismo dos lipídeos.

1.3 METABOLISMO LIPÍDICO

Os lipídeos possuem funções importantes em praticamente todos os aspectos da vida, seja como precursores dos hormônios, fonte de energia, facilitadores no processo da digestão, componentes estruturais da membrana celular, dentre outros (BURTIS *et.al.*, 2008). Além disso, os lipídeos e as lipoproteínas estão intimamente envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose, um processo patogênico que é causa de distúrbios cardiovasculares comuns, tais como infarto do miocárdio, doença cerebrovascular e doença vascular periférica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007; MAGALHÃES *et.al.*, 2004).

Dentre as espécies moleculares lipídicas mais importantes presentes no plasma, do ponto de vista fisiológico e clínico, estão os triglicerídeos e o colesterol (MOTTA, 2003). Devido ao seu caráter apolar, esses lipídeos são transportados por meio de complexos macromoleculares denominados de lipoproteínas (Figura 1). Essas são constituídas por um núcleo hidrofóbico contendo fosfolipídeos, ésteres de colesterol, antioxidantes e vitaminas lipossolúveis, além de uma camada externa hidrofílica composta de colesterol livre, fosfolipídeos e proteínas (chamadas de apolipoproteínas ou "apo") (HEGELE, 2009).

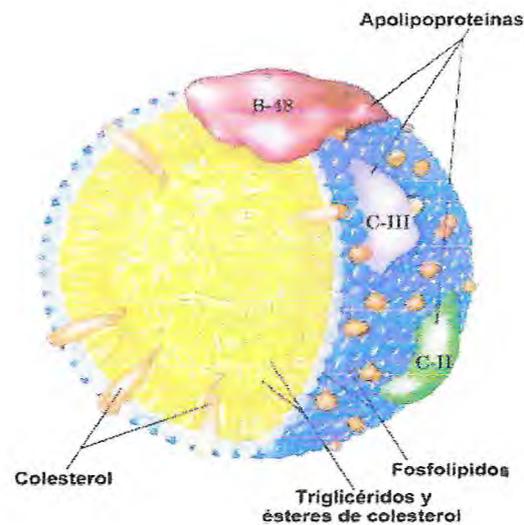


Figura 1. Estrutura das lipoproteínas.

Fonte: NELSON & COX, 2006

1.3.1 Apolipoproteínas

As apolipoproteínas são uma família complexa de polipeptídios que têm por função principal determinar o destino metabólico dos lipídeos no plasma, bem como promover sua captação pelos tecidos. Essas moléculas atuam, ainda, como ativadores e inibidores das enzimas envolvidas no metabolismo das lipoproteínas, sendo divididas em vários grupos, cujos mais importantes são (MOTA, 2003):

- Apo A (sintetizada no fígado e intestino);
- Apo B (presente no plasma de duas formas, ApoB 100 (fígado) e ApoB 48 (intestino); sendo que a primeira é parte integrante da LDL, quilomícrons e VLDL, enquanto que a segunda encontra-se somente nos quilomícrons);
- Apo C (sintetizada no fígado e incorporada à HDL);
- Apo E (incorporada ao HDL e transferida, na circulação, para os quilomícrons e VLDL).

1.3.2 Lipoproteínas

Sabendo-se que os lipídeos são uma classe de compostos solúveis em solventes orgânicos e praticamente insolúveis em água, transportam-se ao longo da corrente sanguínea na forma de lipoproteínas, que são divididas em cinco classes de acordo com sua densidade (SCHIAVO *et. al.*, 2003; GOMES & CARMO, 2006):

- Quilomícrons;
- Lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL);
- Lipoproteínas de densidade baixa (LDL);
- Lipoproteínas de densidade intermediária (IDL);
- Lipoproteínas de alta densidade (HDL).

Além disso, como descrito por KANAAN *et.al.* (2008), as lipoproteínas, em geral, possuem as seguintes características:

Quilomícrons (Qm)

É uma lipoproteína riquíssima em lipídeos que está presente na eletroforese e na ultracentrifugação apenas no período pós-prandial. Origina-se da síntese de lipídeos pelos enterócitos, a partir dos ácidos graxos livres, monoacilglicerol e ésteres de colesterol provenientes da hidrólise intraluminal de gorduras da dieta (origem exógena) na presença de ácidos biliares. Na sua constituição há principalmente Apo C e Apo B48, além do lipídeo predominante ser o triglicerídeo.

Lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL)

A VLDL é a principal lipoproteína encarregada de transportar os triglicerídeos endógenos do fígado para as células periféricas. A apo C é a proteína predominante seguida de apo B100. O lipídeo presente em maior

quantidade é o triglicerídeo, só que em menor proporção se comparado ao Qm, mas por outro lado, possui maior quantidade de colesterol.

Lipoproteína de baixa densidade (LDL)

Na LDL, 45% da sua massa total equivalem a colesterol sendo, portanto, a principal fonte externa desse lipídeo para o suprimento das necessidades celulares, tais como: síntese de hormônios e constituição da membrana plasmática. A apo B100 constitui 95% das apoproteínas presentes na LDL. A obtenção de colesterol endógeno é mediado pela enzima HMG CoA redutase (3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA redutase) que funciona como fator limitante no processo de metabolização.

Lipoproteína de alta densidade (HDL)

A HDL é a lipoproteína mais rica em proteínas, correspondendo a 50% de sua massa total com 30% de fosfolipídeos e 20% de colesterol. Dentre as apolipoproteínas encontradas tem-se apo A-I, apo C e apo E. Seu metabolismo é regulado pela enzima lecitina colesterol acil transferase (LCAT), que tem por função a formação de ésteres de colesterol. Assim, pode-se dizer que a principal função exercida pela HDL é o transporte reverso de colesterol, visto que somente a forma esterificada pode ser eliminada do organismo.

No metabolismo e transporte dos lipídeos, além da presença das lipoproteínas e apolipoproteínas, há algumas enzimas relevantes envolvidas, que são: lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), que esterifica o colesterol remanescente na superfície da HDL; a lipase lipoprotéica (LPL), que atua no catabolismo dos triglicerídeos presentes nos quilomícrons e nas VLDL e a triglicerídeo lipase hepática, que possui função semelhante à lipase lipoprotéica, mas seu substrato são lipoproteínas parcialmente hidrolisadas pela LPL (MOTTA, 2003; BAYNES & DOMINICZAK, 2000). Assim, alterações nos níveis de lipoproteínas circulantes, bem como das enzimas participantes do metabolismo lipoprotéico, acarretam as chamadas dislipidemias.

1.3.3 Dislipidemias

Entende-se por dislipidemias modificações no metabolismo dos lipídeos em qualquer fase e que ocasionem alterações nos níveis séricos das lipoproteínas (CAMBRI, 2006). De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007), podem ser divididas em primárias, quando está relacionada a alterações fenotípicas e secundárias, em consequência à uma doença preexistente ou após o uso de medicamentos.

As projeções da OMS indicam que a morbidade e mortalidade causadas por doenças cardiovasculares (DCVs), nas próximas décadas, se constituirão como a primeira causa de morte tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (MAGALHÃES *et. al.*, 2004). De acordo com as projeções para 2020, os óbitos por doença arterial coronariana (DAC) aumentarão em 100% entre homens e 80% entre mulheres. Estes dados epidemiológicos reforçam a necessidade da implantação de medidas imediatas voltadas à diminuição e controle dos fatores de risco (GATTI *et.al.*, 2008).

Estudos epidemiológicos demonstram que as dislipidemias, juntamente com a hipertensão e o hábito de fumar, são consideradas fatores de risco primários para o desenvolvimento de DCVs (CAMBRI, 2006).

O papel dos lipídeos como importante fator na patogênese da doença arterial coronariana está solidamente estabelecido (FREITAS, 2004). Como citado por Magalhães *et. al.* (2004), as dislipidemias desempenham um importante papel neste cenário, uma vez que participam ativamente da fisiopatologia do processo aterosclerótico, sendo reconhecida, na atualidade, como um dos maiores fatores de risco modificáveis relacionados com o desenvolvimento da DAC.

Os elevados níveis de colesterol e sua relação com a doença coronária aterosclerótica já foi demonstrada em muitos ensaios clínicos e está bem compreendida (JORGE *et. al.*, 1998). Por outro lado, a relação entre os triglicerídeos e o risco de DCVs tem sido assunto de grande interesse, cuja

atuação no desencadeamento fisiopatológico das doenças cardiovasculares ainda não está totalmente elucidada (FREITAS, 2004).

Estudos experimentais têm correlacionado a elevação dos níveis séricos de triglicerídeos ao aumento do risco de doenças coronarianas. Surgem, então, evidências de que a hipertrigliceridemia é um fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, dado efeito aterogênico direto das lipoproteínas ricas em triglicerídeos, particularmente as VLDL (SHIAVO *et.al.*, 2003; MOTTA, 2003).

Dentre os medicamentos utilizados para a redução dos níveis de lipídeos, têm-se visto a prescrição freqüente das estatinas e dos fibratos para a hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, respectivamente. As estatinas são inibidores da HMG-CoA redutase que é uma das enzimas chave na síntese intracelular de colesterol, enquanto que os fibratos agem estimulando os receptores nucleares denominados “receptores alfa ativados de proliferação dos peroxissomas” (PPAR- α), o que leva ao aumento da produção e ação da lipase lipoproteica, que é responsável pela hidrólise intravascular dos triglicerídeos.

Porém, há situações relacionadas ao risco cardiovascular e à necessidade de maior efetividade no controle das dislipidemias mistas (colesterol e triglicérides elevados), sendo nesses casos, a combinação de estatina com fibrato uma opção terapêutica, fato este que implica diretamente em uma maior preocupação com a segurança da terapia. Tal associação pode ser perigosa ao paciente, porque as duas classes desses fármacos, por si só, podem ocasionar miopatia e rabdomiólise e, quando prescritas concomitantemente podem desencadear além das manifestações clínicas citadas, um quadro de hepatite (XAVIER, 2005).

Além das estatinas e dos fibratos, de acordo com a IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007), outros agentes hipolipidêmicos podem ser utilizados na terapêutica e se encontram descritos a seguir:

- ✓ **Ezetimiba** – é um inibidor da absorção de colesterol que atua na borda em escova das células intestinais diminuindo a ação da proteína transportadora do colesterol. Recomenda-se a não administração em pacientes com doença hepática aguda e é comumente associada à sinvastatina (estatina) para potencialização dos efeitos hipolipidêmicos.

- ✓ **Colestiramina** – é uma resina de troca cujo mecanismo é a redução da absorção intestinal de sais biliares e, conseqüentemente, de colesterol. Pode ser utilizada com adjuvante no tratamento com as estatinas. Os principais efeitos colaterais descritos são interferência na motilidade gastrointestinal (constipação), náuseas, meteorismo, exacerbação de hemorróidas pré-existentes, redução na absorção de vitaminas lipossolúveis. Não é recomendado seu uso em pacientes com triglicerídeos $\geq 400\text{mg/dL}$, pois promove hipertrigliceridemia.

- ✓ **Ácido nicotínico** – reduz a ação da lipase tecidual nos adipócitos, levando à menor liberação de ácidos graxos livres para a corrente sanguínea. Os efeitos adversos são principalmente rubor facial e prurido.

- ✓ **Ácidos graxos ômega-3** – são derivados do óleo de peixes provenientes de águas frias e profundas, que reduzem a síntese hepática dos triglicerídeos. Reduzem os triglicerídeos e aumentam o colesterol-HDL, entretanto podem elevar os níveis séricos de colesterol – LDL.

Pode-se inferir que vários fatores conspiram para que as metas de redução dos níveis de lipídeos não sejam alcançadas, desde aqueles relacionados à não aderência ao tratamento até as dificuldades inerentes aos próprios médicos e pacientes, como problemas quanto à intolerância, interação com outras drogas, além dos efeitos adversos dos agentes hipolipemiantes disponíveis no mercado. Além disso, é importante ressaltar que os custos dos medicamentos são um importante fator limitante do seu uso contínuo (MAGALHÃES *et. al.*, 2004)

O elevado custo dos medicamentos redutores dos níveis séricos de lipídeos e a limitação de seu uso prolongado, devido aos seus efeitos colaterais, têm feito os pacientes recorrerem para as terapias alternativas, como solução de seus problemas de saúde relacionados às dislipidemias (JORGE *et. al.*, 1998).

1.4 PLANTAS MEDICINAIS COMO RECURSO TERAPÊUTICO

Ainda que o uso de fármacos permaneça hegemônico, reconhecido como científico e de prerrogativa médica, o uso terapêutico de plantas medicinais, antes situado à margem das instituições de saúde, hoje ultrapassa essas barreiras, tentando legitimar-se nesse meio. A mudança desse panorama se deve às transformações sociais, éticas, políticas e econômicas que influenciam diretamente na saúde das pessoas e, conseqüentemente, nos modelos de cuidar (ALVIM *et.al.*, 2006).

Dentre os motivos que levaram à diminuição do uso das plantas medicinais, ao longo do século XX, pode-se destacar:

- Desenvolvimento científico e tecnológico na área da saúde;
- Desqualificação dos saberes populares e exaltação do conhecimento científico como o único conhecimento correto e confiável;
- Desenvolvimento da indústria farmacêutica e descoberta de novos fármacos;
- Praticidade do uso do medicamento industrializado;
- Falta ou insuficiência de estudos comprobatórios da eficácia e da segurança dos fitoterápicos.

(FIGUEREDO, 2007)

A retomada da medicina alternativa ocorreu devido a uma série de fatores, como por exemplo, aumento dos estudos científicos que comprovam a sua eficácia, segurança e efetividade; tradição cultural do uso de plantas

medicinais; facilidade de preparação dos remédios à base de plantas e o fato delas poderem ser cultivadas em locais próximos às residências, facilitando o acesso a elas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Além disso, na última década, registrou-se um aumento expressivo no interesse em substâncias derivadas de espécies vegetais, evidenciado pelo crescimento de publicações dessa linha de pesquisa nas principais revistas científicas das áreas de química e farmacologia (CALIXTO, 2000).

Grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não tem estudos para permitir a elaboração de monografias completas e modernas. Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra que em um país como o Brasil, com enorme biodiversidade, existe uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e poucas pesquisas (FOGLIO *et.al.*, 2006).

A cada momento são relatadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica, como por exemplo, o taxol, a forskolina, a artemisinina, entre outros. Neste contexto é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica, como a digoxina (FILHO & YUNES, 1998).

Em todo o mundo, apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos. Esses dados demonstram o enorme potencial das plantas para a descoberta de novos fitoterápicos e fitomedicamentos (FOGLIO *et.al.*, 2006)

A análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa do que se imagina, uma vez que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos. Dessa forma, verifica-se a necessidade de um trabalho em colaboração mais ampla

entre químicos e farmacólogos para a análise de extratos, onde se obtém extratos semi-puros, frações e finalmente, os compostos puros. Neste sentido, torna-se indispensável a análise da potência das frações e das substâncias puras em relação à sua concentração (FILHO & YUNES, 1998).

As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados, podem apresentar afeitos sinérgicos entre os princípios ativos devido a presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade (MACIEL *et.al.*, 2002). Assim, merece ser revista a abordagem de algumas indústrias farmacêuticas ou grupos de pesquisas, que selecionam um dos compostos ativos, geralmente os mais abundantes, e desprezam a mistura, que na maioria das vezes parece ser mais efetiva que uma substância ou molécula isolada. Acredita-se que o sinergismo e a associação de mecanismos permitirão, no futuro, o desenvolvimento de recursos terapêuticos alternativos mais seguros e menos agressivos ao organismo (YUNES, 2001).

Diante do exposto, paralelo a estudos de identificação de novos compostos detentores de efeito terapêutico não se devem esquecer a importância da investigação toxicológica dos mesmos, para que possam vir a ser utilizados com segurança.

1.5 INVESTIGAÇÃO TOXICOLÓGICA DE PRODUTOS NATURAIS

Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, ainda existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Tais fatos, associados com a fácil aquisição e a grande tradição do uso de plantas medicinais têm contribuído para a utilização dessas pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA-JÚNIOR, 2005).

É interessante ressaltar que, no Brasil, o grande uso de plantas com finalidade terapêutica também se deve a tendência dos consumidores a utilizar produtos de origem natural, decorrente de uma “consciência ecológica” estabelecida nos últimos anos, que tem sido exaustivamente enfatizada pela mídia contribuindo, conseqüentemente, para o aumento do consumo desses produtos (SILVEIRA, 2008)

Entre os adeptos da fitoterapia, é comum o pensamento de que as plantas medicinais de uso tradicional já foram testadas e homologadas pelo seu uso prolongado na própria espécie humana. Por essa razão, seriam remédios eficazes e seguros, naturalmente balanceados, sem os efeitos colaterais comuns dos produtos sintéticos (LAPA *et. al.*, 2007).

Entretanto, o uso de produtos naturais mostrou, ao longo dos anos, ser perigoso, já que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente tóxicas e perigosas à saúde humana. Além disso, muitas vezes, as supostas propriedades farmacológicas anunciadas não possuem validade científica, por não terem sido investigadas, ou por não possuírem suas atividades farmacológicas comprovadas em testes pré-clínicos ou clínicos, além de haver riscos aos usuários, uma vez que também não foram realizados testes toxicológicos (VEIGA-JÚNIOR, 2005).

Dessa forma, a atenção dirigida pelas autoridades e administrações de saúde para o uso de plantas medicinais aumentou consideravelmente nos últimos anos (SILVEIRA, 2008). No Brasil, um exemplo de tal preocupação, foi a elaboração da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 48 de 16 de março de 2004, que regulamenta as condições para registro e comercialização de fitoterápicos em todo território nacional (BRASIL, 2004a). Foi publicado, também, o “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica e clínica de fitoterápicos” encontrado em maiores detalhes na Resolução Especial (RE) nº 90 de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2004b).

Um teste que vinha sendo empregado, há anos, para avaliar a toxicidade aguda e ganhou espaço nos laboratórios de pesquisas pré-clínicas, era o teste

da DL₅₀, que corresponde à dose letal de uma determinada substância capaz de promover a morte da metade dos animais do grupo teste (VALADARES, 2006). Após muitos anos de controvérsias e debates, finalmente o teste da DL₅₀ foi abolido em meados de 2002 (BOTHAN, 2004).

Diante desse fato, surgiram os testes alternativos empregados na atualidade para prover a toxicidade oral aguda de determinada substância, tais como: teste da dose fixa, teste de toxicidade aguda de classe e teste do *up-and-down*, que trouxeram significativa melhora para o bem-estar animal (VALADARES, 2006). O teste de dose fixa tem como princípio identificar a menor dose que causa toxicidade evidente, obtendo-se a DL₅₀ estimada e sinais de toxicidade aguda (OECD 420). O teste de toxicidade aguda de classe também utiliza o conceito de doses fixas, porém o objetivo final é contabilizar a mortalidade (OECD 423), enquanto que o teste do *up-and-down* desponta como um dos mais promissores, pelo menos do ponto de vista ético animal. Esse último tem como intuito estimar o valor da DL₅₀ testando seqüencialmente animais individuais, com a dose para cada animal sendo ajustada para cima ou para baixo, de acordo com o resultado obtido do animal anterior (OECD 425) (LIMA, 2009).

A toxicologia é uma ciência muito antiga que, no início, era conhecida como “ciência dos venenos”. Hoje, ela é definida como o “estudo dos efeitos adversos de agentes exógenos sobre os sistemas biológicos ou organismos vivos, incluindo o homem, tendo como principal objetivo o estabelecimento da magnitude dos danos potenciais e o uso seguro das substâncias químicas” (OLIVEIRA-FILHO, 2003; MEYER, 2003; CAZARIN *et.al.*, 2004)

Os possíveis efeitos adversos, de acordo com Calixto (2000) e Silveira (2008), podem ser de dois tipos: reações intrínsecas e extrínsecas. Intrínsecas são aquelas reações inerentes a sua constituição química, podendo ser relacionado a sua toxicidade, superdosagem e/ou interação com outros fármacos. Enquanto que as extrínsecas estão relacionadas com as falhas oriundas do processo de fabricação, como falta de padronização,

contaminação, adulteração, preparação, bem como estocagem incorreta e rotulagem inapropriada.

As plantas medicinais utilizadas em medicamentos são xenobióticos, isto é, um produto estranho ao organismo humano, nele introduzido com finalidades terapêuticas. Entretanto, como toda substância estranha, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos e assim devem ser encarados até que estudos científicos sejam realizados (LAPA *et. al.*, 2007).

O uso de plantas frescas, temperatura, luminosidade, período e método de coleta, transporte, embalagem, idade e parte da planta coletada, podem interferir na qualidade e nos valores terapêuticos atribuídos a esses vegetais, uma vez que possíveis substâncias potencialmente tóxicas podem ser produzidas durante esses processos (CAMPESTO, 2005).

Por outro lado, a utilização inadequada de um produto, mesmo de baixa toxicidade, pode induzir problemas graves. Isso se deve ao fato da existência de fatores de risco tais como contra-indicações ou o uso concomitante de outros medicamentos, o que pode agravar a saúde do paciente, pois pelo menos, metade dos consumidores que utilizam plantas medicinais não informa ao seu médico do uso desse recurso como tratamento alternativo. Tal fato aumenta ainda mais os riscos ao paciente em função do desconhecimento das possíveis interações existentes entre as plantas e os medicamentos da medicina convencional (VEIGA-JÚNIOR *et.al.*, 2005)

Segundo Turolla e Nascimento (2006), mesmo com o aumento da importância dos fitoterápicos, estudos ainda são insuficientes para comprovação da eficácia e segurança da utilização dessas plantas como medicamento, e muitas continuam a ser utilizadas apenas com base no conhecimento do seu uso popular.

Diante desse cenário, se a intenção é utilizar uma planta medicinal com finalidade terapêutica, ela deve ser previamente validada, isto é, ter sua ação comprovada e sua toxicidade potencial avaliada cientificamente na espécie

humana, como qualquer outro medicamento (LAPA *et. al.*, 2007). Dessa forma, estudos multidisciplinares, associando fitoquímicos e farmacologistas, tornam-se cada vez mais importantes para a definição dos potenciais terapêuticos e tóxicos dos extratos vegetais (MACIEL *et.al.*, 2002).

Dentro do contexto de plantas medicinais, verifica-se o surgimento de preocupações relacionadas ao impacto da utilização de corantes sintéticos sobre a saúde, direcionando as atenções para o uso daqueles de origem natural, pela crença de serem desprovidos de efeitos tóxicos (COSTA & CHAVES, 2005). Assim, os corantes naturais tem sido alvo de estudos devido a substituição crescente dos aditivos alimentares sintéticos além de suas potencialidades terapêuticas.

1.6 CORANTES NATURAIS

A facilidade de padronização dos corantes sintéticos, associada ainda à sua grande disponibilidade muito contribuiu para a sua expansão ao longo dos anos. No entanto, na década de 70 foi constatado que estes se apresentavam como potenciais causadores de doenças degenerativas como câncer, deformações teratogênicas, danos cardiovasculares, entre outros (OLIVEIRA, 2005)

Dessa forma, a tendência mostrada pelo mercado globalizado em diminuir o uso de corantes sintéticos em alimentos e as restrições impostas pela Organização Mundial de Saúde tem levado a indústria e pesquisadores ao interesse pelos recursos naturais, em particular os vegetais, que podem ser utilizados como corantes, principalmente em nosso país, devido sua grande biodiversidade (ALVES, 2005).

Assim, os corantes artificiais foram progressivamente substituídos pelos corantes naturais devido a maior estabilidade, poder de coloração e menor preço, além de garantirem a uniformidade dos alimentos produzidos em larga escala. O Brasil permite o uso dos seguintes corante artificiais: tartrazina,

amarelo crepúsculo, amaranço, ponceau 4R, vermelho 40, eritrosina, azul indigotina, azul brilhante, verde rápido, azul patente V e azorrubina (PRADO, 2004).

A utilização de coloríferos é justificada pelo fato da maioria dos alimentos industrializados não apresentarem sua cor original, enquanto que em outros a cor é alterada ou destruída durante o processamento. Com isso, verificou-se a necessidade do uso de corantes para realçar o aspecto perdido, além de aumentar a aceitabilidade do produto frente ao consumidor, uma vez que a percepção do mundo ao nosso redor é dada pelos nossos sentidos. Desses, o impacto visual é o mais marcante, sendo definido pela forma, pelo aspecto e pela cor dos objetos e alimentos (OLIVEIRA, 2005).

É fato conhecido que essa característica organoléptica, a coloração, influencia de forma decisiva na preferência do consumidor ao adquirir determinado produto. Dos três principais atributos de qualidade dos alimentos – cor, sabor e textura, a cor é o mais importante e seguramente o mais notado, tornando-se um indicador de qualidade de determinado alimento no momento da compra (CONSTANT, 2002).

Os corantes naturais, por sua vez, são apresentados em versões hidrossolúveis, lipossolúveis, líquidas, pós, microencapsuladas, dentre outras, fato esse que permite a utilização deles em aplicações distintas através de um portfólio completo de cores. Essas substâncias, atualmente, possuem estabilidades comparáveis aos corantes sintéticos artificiais, com o diferencial de apresentarem características funcionais, fitonutrientes, além de serem mais saudáveis, o que agrada às tendências mundiais de mercado, conferindo uma aparência natural e diferenciada aos alimentos (PRADO & GODOY, 2004; CONSTANT, 2002).

Neste contexto, o urucum (*Bixa orellana L.*) desponta como um dos mais utilizados no país, sob a forma de extratos (lipossolúveis e hidrossolúveis), pastas, suspensões e pós. Este último, denominado de colorífico (colorau), é

bastante utilizado como condimento em diversas preparações de alimentos na região Nordeste.

1.7 *Bixa orellana* L. E SUAS POTENCIALIDADES TERAPÊUTICAS

A *Bixa orellana* L. é uma planta originária da América tropical, sendo cultivada principalmente para fins industriais no Peru, Bolívia, Paraguai e Brasil (MATOS *et.al.*, 2004). Universalmente, pertence à família *Bixaceae* e ao gênero *Bixa* (FRANCO *et.al.*, 2002).

Trata-se de um arbusto com aproximadamente 4,5 metros de comprimento, possuindo tronco revestido de casca parda e copa bem desenvolvida. Seu fruto é uma cápsula ovóide, deiscente, com dois ou três carpelos cobertos de espinhos flexíveis, de cor vermelha, esverdeada ou parda, com 3-5cm de comprimento. Dentro de cada cápsula (cachopa) há, em média, 35 a 54 sementes (Figura 2), sendo estas cobertas por um arilo ceroso de cor vermelha e odor característico (MATOS *et.al.*, 2004). As folhas (Figura 3) são alternadas, de 10 a 20cm de comprimento e 5 a 10cm de largura, pontiagudas, de cor verde em ambas as faces e com pecíolo alargado (REVILLA, 2001).



Figura 2. Sementes de *Bixa orellana* L.

Fonte: Disponível em: <<http://aidanbrooksspices.blogspot.com/>>



Figura 3. Folhas e flores da *Bixa orellana* L.

Fonte: Disponível em: <<http://olhares.aeiou.pt/>>

Essa espécie vegetal foi assim denominada como uma forma de homenagem ao primeiro botânico que a estudou cujo nome era Francisco de Orellana (GIULIANO *et.al.*, 2003).

Os primeiros registros escritos sobre essa planta datam de 1500, na Carta de Pero Vaz de Caminha ao Rei D. Manoel, quando do descobrimento do Brasil. Nessa carta eram feitas várias menções sobre espécies vegetais que aqui existiam, porém a única espécie sobre a qual a identificação não havia dúvidas era o urucum. Caminha descrevia esse vegetal como:

“... uns ouriços cheios de uns grãos vermelhos pequenos que esmagados entre os dedos faziam tintura vermelha. E quanto mais se molhavam, tanto mais vermelhos ficavam”.

(FILGUEIRAS & PEIXOTO, 2002)

Pode ser encontrada em diversas regiões no mundo com diferentes nomes: arnoto (em Ceilão); atolé, achiote, bija (Peru e Cuba); axiote (México); Bixa (Guiana); roucou, rocouyer (França); achiote e urucu (Bolívia); *annato* e *annato-tree* (Inglaterra); urucu (Argentina). No Brasil, essa espécie é conhecida

com os nomes de urucum, urucu, açafroeira da terra, dentre outros (SILVA & FRANCO, 2000).

Dentre as partes da planta mais utilizadas têm-se as sementes, seguida das folhas e raízes. Das sementes obtêm-se os pigmentos bixina e norbixina, responsáveis pela coloração vermelha, sendo usados inicialmente como tintura corporal pelos índios, e que, nos últimos anos, vêm ganhando importância no mercado pela sua aplicação como corantes naturais nas indústrias de alimentos, laticínios, bebidas, tintas, cosméticos, farmacêutica e têxtil (CARVALHO, 2005; ALONSO, 2004).

Esses pigmentos são conhecidos comercialmente como *annatto* e aproximadamente 80% corresponde à bixina, um carotenóide que possui uma carboxila livre e uma carboxila esterificada (PRESTON & RICKARD, 1980). A remoção hidrolítica do grupo éster metil da bixina, pela saponificação, origina a norbixina, um carotenóide solúvel em água, também presente em menor quantidade nas preparações com *annatto* (MERCADANTE, 1997 e 1999).

A *Bixa orellana* tem sido usada na medicina popular brasileira para preparar porções afrodisíacas bem como remédios para tratar febres, condições inflamatórias e doenças parasitárias (SHILPI *et.al.*, 2006). Além disso, é um importante condimento empregado na culinária nordestina, onde a preparação comercial destinada para tal fim é conhecida com o nome de colorau. Este é produzido a partir das sementes previamente aquecidas a 70°C em óleo vegetal, seguido de acréscimo de fubá ou farinha de mandioca. Outra forma de obtenção é a mistura dos últimos ingredientes com o pó das sementes de urucum oriundo do processo de extração com solventes orgânicos (COSTA & CHAVES, 2005)

Especialmente no Ceará, Nordeste do Brasil, as sementes de urucum são amplamente utilizadas sob a forma de chás, decoctos ou as próprias sementes inteiras, com a finalidade de reduzir os níveis séricos de lipídios. São facilmente encontradas em feiras populares e indicadas indiscriminadamente por “raizeiros” e vendedores de ervas, havendo, até o momento, poucas

evidências científicas dessas propriedades terapêuticas (FERREIRA, 2007b; FERREIRA, 2008). Alguns estudos têm indicado a presença de efeito redutor dos níveis de colesterol total em aves e coelhos (SILVA *et.al.*, 2001; OLIVEIRA *et.al.*, 2006; LIMA *et.al.*, 2001), mas muito pouco tem sido inferido, em espécies de roedores, sobre os níveis séricos de triglicerídeos.

A literatura científica tem atribuído que, algumas partes dessa planta, destacando-se principalmente as folhas e as sementes, são detentoras de ações terapêuticas. Leonardo (2007) cita que no Peru, o chá preparado da decocção das folhas de *Bixa orellana* é utilizado no tratamento de problemas de próstata e inflamação interna, hipertensão arterial, colesterol alto, cistite, obesidade, insuficiência renal e na eliminação do ácido úrico.

Na Jamaica, de acordo com Paumgarten *et.al.* (2002), essa espécie vegetal tem sido usada, na forma de chá, para o tratamento do diabetes mellitus. Estudos realizados por Fernandes *et.al.* (2002) com norbixina tem demonstrado uma ação hiperglicêmica em ratos e hipoglicêmica em camundongos, o que implica que dependendo da espécie utilizada no modelo experimental podem ser encontrados efeitos distintos no metabolismo da glicose.

De acordo com Fleischer *et al.* (2003) e Alonso (2004), o extrato etanólico das folhas do urucum apresentam atividade antimicrobiana para os microorganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Entretanto, o extrato etanólico das sementes não apresentou atividade considerável. Ainda sobre as folhas dessa planta, tem sido evidenciada uma ação neutralizante dos efeitos hemorrágicos oriundo do veneno de *Bothrops atrox* (OTERO *et.al.*, 2000).

Estudos farmacológicos conduzidos por Villar *et.al.*, (1997) e Barrio *et.al.* (2004) têm demonstrado que o extrato de *Bixa orellana* possui atividades anti-protozoária, anti-helmíntica e antiagregante plaquetária.

Estudos recentes têm atribuído propriedades biológicas e médicas aos pigmentos naturais (RIVERA-MADRID *et.al.*, 2006). Aos carotenóides são atribuídas propriedades antioxidantes, sendo de grande importância na prevenção da aterosclerose, pois se sabe que a lipoproteína LDL, quando oxidada, danifica o endotélio e, por conseguinte, a ação antioxidante dos carotenóides, nos quais se inclui a bixina e a norbixina, protegeria o endotélio da ação desta lipoproteína. De acordo com Fontana *et.al.* (2000), as lesões ateroscleróticas iniciam-se após algum tipo de injúria ao endotélio e, normalmente, os carotenóides são captados neste processo e impedem a oxidação da LDL. Devido a sua composição, rica nesses pigmentos, há a necessidade de se investigar o potencial terapêutico das sementes do urucum.

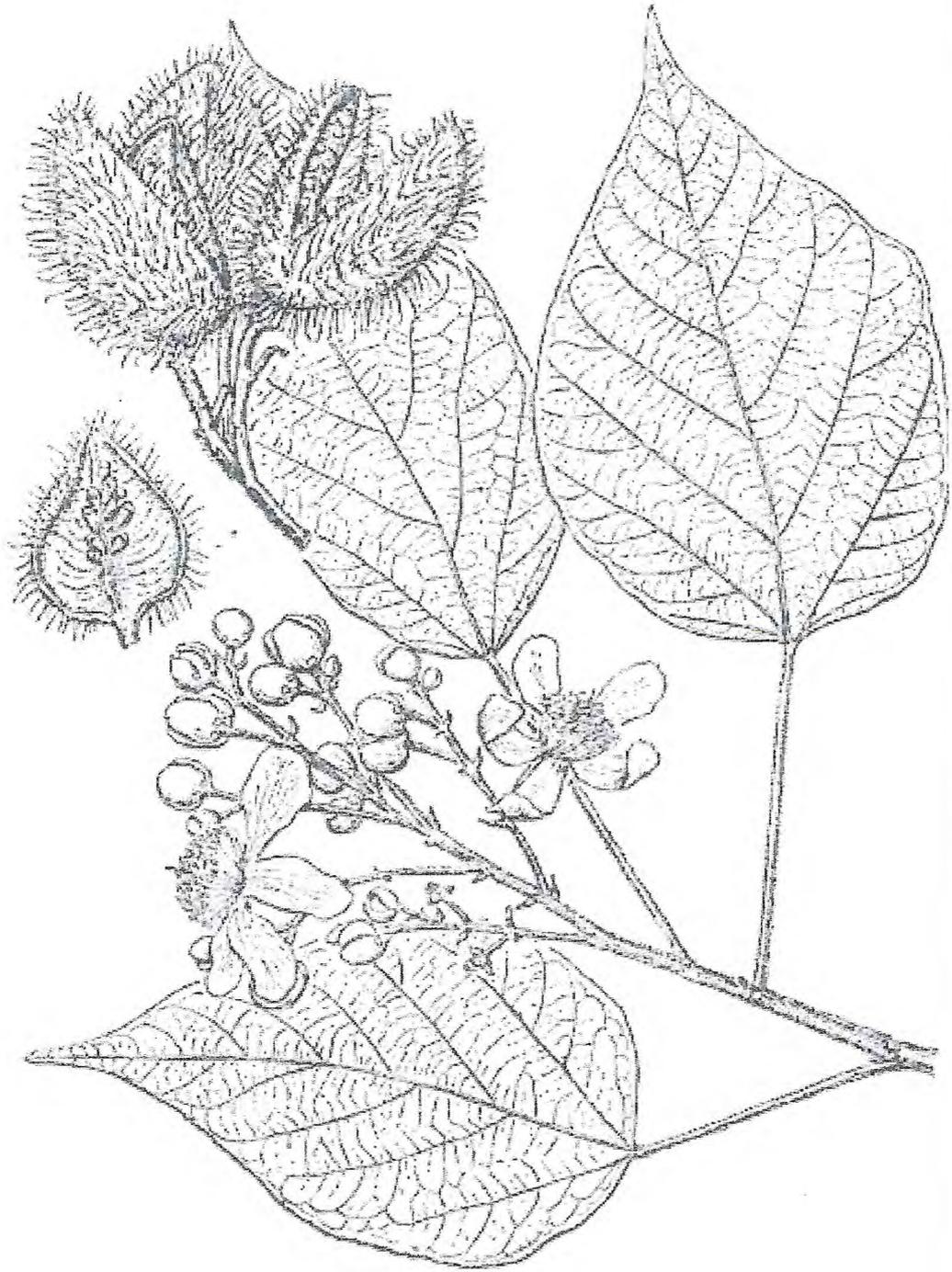
Estudos epidemiológicos têm estabelecido a importância de fatores dietéticos no desenvolvimento de doenças cardiovasculares em homens e animais, verificando uma relação direta entre o nível de lipídeos no sangue e grau de aterogênese. (CASTILLO *et.al.*, 1994). Dessa forma, a investigação lipídica é de grande importância para o controle da aterosclerose, uma das principais causas de morte no mundo moderno. A investigação do efeito hipolipemiante em espécies vegetais é de grande relevância na redução da morbimortalidade por doenças cardiovasculares, contribuindo para o aumento da expectativa de vida da população.

Os dados da literatura, no que se refere à toxicidade e o potencial terapêutico dos corantes e produtos naturais, ainda são escassos e necessitam que mais trabalhos sejam realizados para avaliar tais efeitos (PAUMGARTTEN *et.al.*, 2002). A falta de informações relacionadas à norbixina, bixina e outros componentes da *Bixa orellana* foi evidenciado em 2002, quando o Secretariado da Junta Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO), com especialidade em Aditivos Alimentares, requisitou informações relacionadas à toxicidade, absorção e especificações do extrato de *Bixa orellana* para que a mesma fosse utilizada de forma segura pela população (TENNANT & O'CALLAGHAN, 2005).

Além disso, o consumo dos pigmentos de *annatto* nos países da América Latina é facilmente excedido no que diz respeito à ingestão diária permitida. Em 2006, no encontro da Junta *Food and Agriculture Organization*, foram especificados novos limites permitidos para ingestão diária dos pigmentos, sendo de 0-12mg/kg e 0-0,6mg/kg, para bixina e norbixina, respectivamente (FAO/JECFA, 2006). O levantamento realizado para averiguar o percentual de ingestão de bixina no Brasil tem mostrado que seu nível de consumo, por grande parte da população, é aproximadamente 150% maior que o valor da ingestão máxima diária preconizada (WHO, 2000; PAUMGARTTEN *et.al.*, 2002; FELICISSIMO *et.al.*, 2004). A constatação desse fato é explicada pelo emprego extensivo das sementes de *Bixa orellana* na culinária brasileira, bem como sua inserção em uma vasta gama de alimentos, como já mencionado anteriormente.

Diante desse cenário, levanta-se o questionamento se a ingestão de grandes quantidades dessas sementes seja com a finalidade de colorífero nas refeições ou como alternativa terapêutica para tratamento de patologias, oferece algum risco à população brasileira.

Portanto, verifica-se a importância de se realizar uma investigação científica das propriedades hipolipidêmicas e a avaliação toxicológica das sementes de *Bixa orellana*, uma vez que essas são amplamente utilizadas pela população *in natura*.



**O
B
J
E
T
I
V
O
S**

2. OBJETIVOS

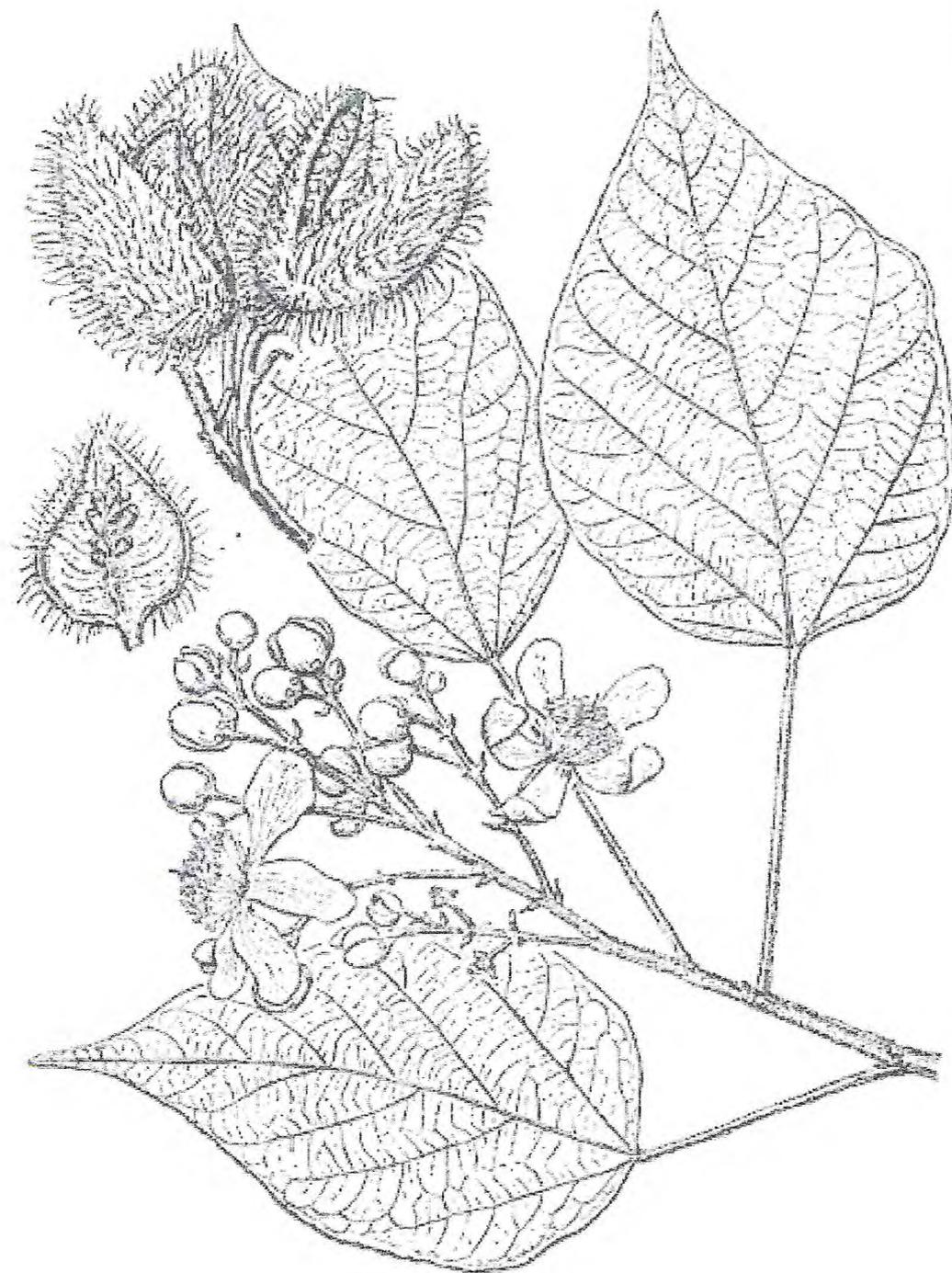
2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial terapêutico e a toxicidade da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* no tratamento de dislipidemias contribuindo para sua utilização com eficácia e segurança.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar o efeito da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) sobre o metabolismo lipoproteico de camundongos através de modelo experimental de indução de dislipidemia com Triton[®] WR1339 e etanol;
- ✓ Verificar o efeito da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) e suas partições hexânica, clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica sobre o metabolismo lipoproteico e glicêmico de camundongos através de modelo experimental de indução de dislipidemia com Poloxamer[®] 407;
- ✓ Investigar o efeito da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) e sua partição clorofórmica sobre o metabolismo glicêmico e lipoproteico, bem como a função renal e hepática, no modelo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada;
- ✓ Estudar a toxicidade oral aguda da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) através da metodologia do *up-and-down*;
- ✓ Verificar a toxicidade renal, hepática e pancreática após administração de doses repetidas por 30 e 90 dias da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO);

- ✓ Identificar o padrão hematológico após administração de doses repetidas por 30 e 90 dias da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO);
- ✓ Analisar macro e microscopicamente os órgãos rim, fígado, coração e pulmão dos animais tratados por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO).



M
A
T
E
R
I
A
I
S

E

M
É
T
O
D
O
S

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO AQUOSA DAS SEMENTES DE *Bixa orellana*

As sementes de *Bixa orellana* foram coletadas na cidade de Fortaleza – Ceará. Antes do início das atividades experimentais, realizou-se a exsiccata da planta que foi devidamente catalogada e depositada (nº 040411) no Herbário Prisco Bezerra, localizado no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Para a obtenção da suspensão, as sementes foram trituradas mecanicamente em um moinho (Fritsch® - Pulverisette 14®, malha de 0,5mm), seguida de uma extração por infusão com água destilada durante 30 minutos, na qual a relação de pó de semente/solvente foi de 30g/150mL de água. Realizou-se, posteriormente, uma filtração do produto obtido e o resíduo seco foi determinado a partir da pesagem de 10mL do filtrado em cápsulas de porcelana previamente secas e taradas. Em seguida, esse volume foi submetido à evaporação, em estufa com circulação de ar (Nova Ética®) à 105°C obtendo-se, através de técnicas gravimétricas, a quantidade de resíduo por cada mL de suspensão preparada.

3.2 OBTENÇÃO DAS PARTIÇÕES ORIUNDAS DA SUSPENSÃO AQUOSA DAS SEMENTES DE *Bixa orellana*

Após a obtenção da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana*, a mesma foi submetida a partições com vários solventes orgânicos de acordo com a escala de polaridade do mais apolar para o menos apolar, na seqüência, foram os seguintes: hexano, clorofórmio, acetato de etila, n-butanol (Figura 4). As partições foram armazenadas em frasco âmbar até o momento da sua dispersão em veículo adequado para administração oral.

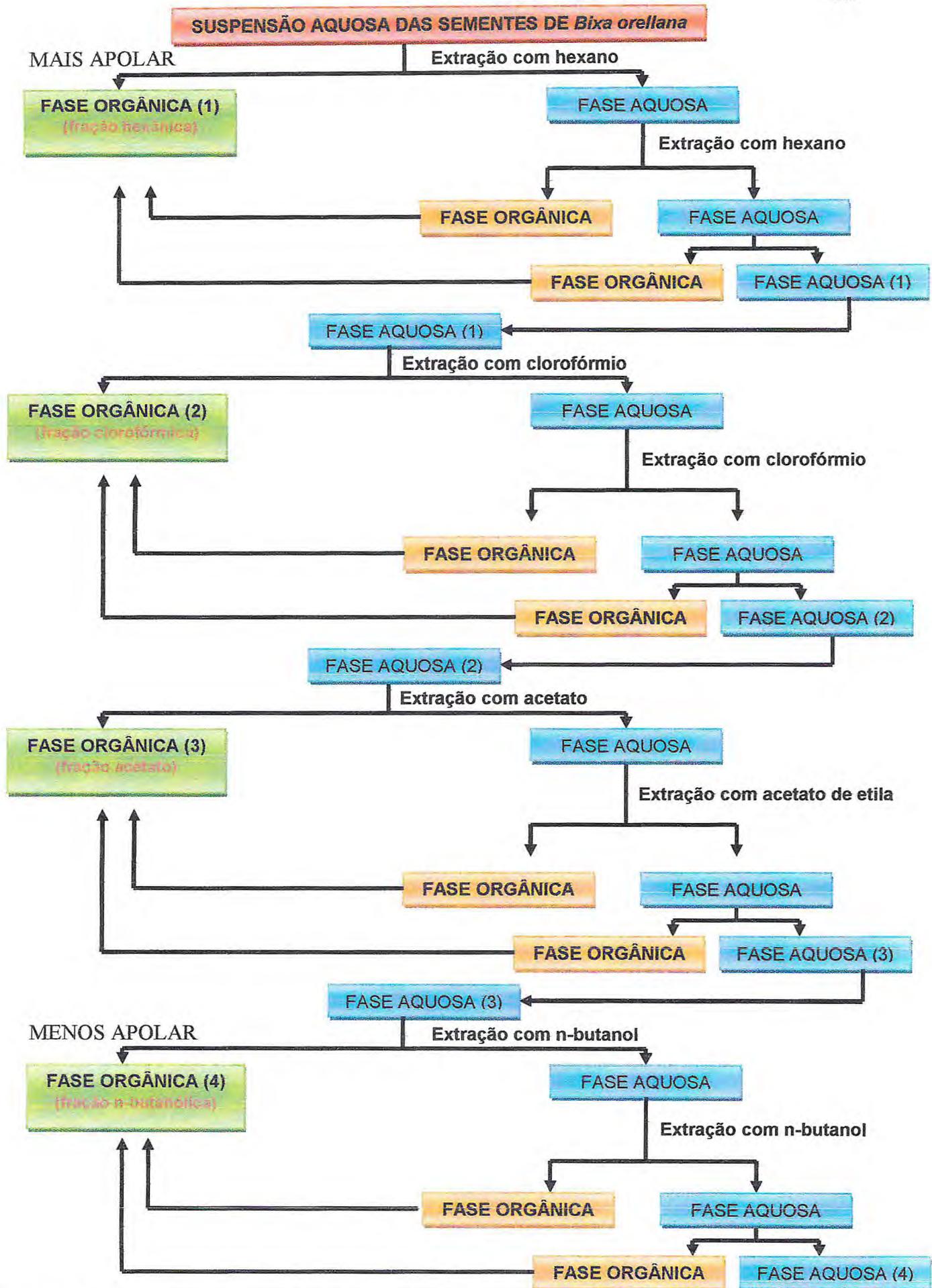


Figura 4. Método de obtenção das partições hexânica, clorofórmica, acetato de etila e n-butanolica oriundas da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana*.

3.2.1 Obtenção da fração hexânica

A suspensão aquosa das sementes de urucum (150mL) e o hexano (150mL) foram colocados em um funil de separação. Em seguida, realizou-se homogeneização e aguardou-se a visualização da separação de fases.

A fase orgânica foi reservada, enquanto que a fração aquosa foi submetida a mais 2 extrações com hexano (100mL e 50mL) objetivando o esgotamento da fase aquosa. Cada fase orgânica obtida nas extrações subseqüentes foi adicionada as anteriores.

A fase orgânica (1) foi denominada, então, de fração ou partição hexânica que foi, em seguida, filtrada com algodão e sulfato de sódio, para reter possíveis partículas bem como possibilitar a eliminação da água. A fase aquosa (1), por sua vez, foi reservada para a preparação da fração clorofórmica.

Após a filtração, todo o material obtido da fase orgânica (1) foi submetido ao rotaevaporador (Heidolph® - Laborota 4000®) para evaporação do solvente, mediante rotação de 90rpm e temperatura de 60°C, obtendo-se um resíduo seco, cujo rendimento foi de 0,21%

3.2.2 Obtenção da fração clorofórmica

A fase aquosa (1) restante da obtenção da fração hexânica foi acrescida de clorofórmio (150mL), em funil de separação, e submetida à agitação. Quando se constatou a separação de fases, a fase orgânica foi novamente reservada, enquanto que a fase aquosa foi submetida a duas extrações subseqüentes com o mesmo solvente (100mL e 50mL de clorofórmio). Cada nova fase orgânica obtida foi adicionada à primeira.

A fase orgânica (2) foi denominada, então, de fração ou partição clorofórmica, filtrada com algodão e sulfato de sódio. A fase aquosa (2), por sua vez, foi reservada para a obtenção posterior da fração acetato de etila.

Após a filtração do material obtido da fase orgânica (2), evaporou-se o solvente em rotaevaporador (Heidolph® - Laborota 4000®) com rotação de 90rpm e temperatura de 60°C, obtendo-se um resíduo seco cujo rendimento foi de 1,15%.

3.2.3 Obtenção da fração acetato de etila

Acrescentou-se, em funil de separação, acetato de etila (150mL) à fase aquosa (2) oriunda da obtenção da fração clorofórmica. Essas fases foram submetidas à agitação. Após a verificação da separação de fases, fase aquosa e fase orgânica, esta última foi reservada, enquanto que a fase aquosa foi exposta a mais duas extrações seqüenciais com o mesmo solvente (100mL e 50mL), o acetato. Foi feito um *pool* de todas as fases orgânicas obtidas.

A fase orgânica (3) foi denominada, então, de fração ou partição acetato de etila, filtrada com algodão e sulfato de sódio. A fase aquosa (3) foi reservada para a obtenção posterior da fração n-butanólica.

O solvente da partição acetato foi evaporado em rotaevaporador (Heidolph® - Laborota 4000®) com rotação de 90rpm e temperatura de 60°C, obtendo-se um resíduo seco cujo rendimento foi de 1,28%.

3.2.4 Obtenção da fração n-butanólica

Realizou-se o mesmo procedimento de obtenção das partições anteriores utilizando-se o n-butanol (150mL) como solvente para extração. A fase orgânica (4) foi posteriormente filtrada com algodão e sulfato de sódio, sendo denominado, o material obtido, de fração ou partição n-butanólica.

O n-butanol foi evaporado em rotaevaporador (Heidolph® - Laborota 4000®) utilizando-se temperaturas elevadas, por volta de 105°C, dado o alto ponto de ebulição desse solvente, obtendo-se um resíduo seco, cujo rendimento final foi de 8,23%.

3.3 DOSES DE SUSPENSÃO AQUOSA DAS SEMENTES DE *Bixa orellana* E FRAÇÕES OBTIDAS

Para o teste do *up-and-down*, um procedimento experimental preliminar de toxicidade oral aguda, utilizou-se as doses de 2000mg/kg e 5000mg/kg de SABO, como preconizado pela OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) 425.

A avaliação toxicológica de doses repetidas bem como o potencial hipolipidêmico da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO), foram realizadas com as doses de 200mg/kg (SABO 200), 400mg/kg (SABO 400) e 800mg/kg (SABO 800). Essas concentrações (mg/kg) foram escolhidas mediante resultados anteriores encontrados em projetos de pesquisa desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica Clínica (UFC). (FERREIRA *et.al.*, 2007; FERREIRA *et.al.*, 2008).

Em relação às partições, após a determinação do rendimento das frações mencionadas, realizaram-se cálculos utilizando-se regra de três simples, de forma a se obter uma dose da partição proporcional à que seria encontrada na SABO na dose mais elevada (800mg/kg). O objetivo da obtenção das partições supracitadas foi de verificar a polaridade da substância presente na suspensão responsável pelos possíveis efeitos hipolipidêmicos.

Seguindo o mesmo raciocínio do cálculo da dose das partições descrito acima, foram preparadas três doses da fração clorofórmica, de forma a se obter uma dose equivalente ao que seria encontrado na SABO 200mg/kg, 400mg/kg e 800mg/kg. As doses de partição clorofórmica encontradas foram de: 9,2mg/kg (CLO 1), 4,6mg/kg (CLO 2) e 2,3mg/kg (CLO 3); sendo tais valores equivalentes à SABO 200, SABO 400 e SABO 800, respectivamente.

3.3.1 Dispersão das partições em veículo

Todas as partições obtidas foram dispersas em veículo oral cuja composição foi de carmelose, goma xantana, glicerol, acessulfame k, metilparabeno, propilparabeno e água purificada q.s.p. 100%. Para facilitar a dispersão das frações no veículo foi utilizado agitador magnético (Biomixer[®]), cujo recipiente utilizado no processo continha uma barra imantada revestida com teflon[®] (20mm x 9mm).

3.4 DROGAS E REAGENTES UTILIZADOS

As drogas e reagentes utilizados ao longo da execução do presente trabalho encontram-se listadas logo abaixo com seu respectivo fabricante/ marca.

- Etanol P.A. - Vetec[®], Brasil
- Triton WR-1339 (tyloxapol[®]) - Sigma Aldrich[®], EUA
- Poloxamer 407 (Pluronic[®] -127) - BASF[®], EUA
- Gemfibrozil - EMS[®], Brasil
- Kits de diagnóstico - Labtest[®],/Bioclin[®], Brasil
- Heparina sódica - Cristália[®], Brasil
- EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetracético Sódico) - Labtest[®], Brasil
- Coloração panótica Instant-Pro[®] - New Prov[®], Brasil
- Formol - Vetec[®], Brasil
- Ácido cólico - Inlab[®], Brasil
- Colesterol - Vetec[®], Brasil
- Sinvastatina - EMS[®], Brasil

3.5 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Utilizaram-se camundongos *swiss* (25-35g) e ratos *wistar* (100-200g) albinos, adultos e machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, aclimatizados

entre $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com ciclos de claro/escuro de 12 em 12h e circulação de ar controlados, recebendo ração padrão (purina chow- Biotec[®]) e água *ad libitum*.

3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.6.1 Avaliação da toxicidade oral aguda pelo teste do *Up-and-Down* em camundongos

Para a realização do teste de toxicidade oral agudo conhecido como *up-and-down* (OECD 425) foram utilizados camundongos machos ($n=5$), pesando entre 25-35g. Os animais foram mantidos em jejum alimentar por 4h antes da administração da SABO 2000mg/kg. Os efeitos tóxicos que porventura pudessem ser manifestados devido à ingestão da suspensão tais como alterações de pêlo, pele e mucosas, comportamento, convulsões, diarreia, letargia e coma foram observados por 60 minutos e 24h horas após o tratamento. Todos os animais ainda foram observados diariamente, durante um período de 14 dias após a primeira administração, sendo posteriormente sacrificados para a retirada dos órgãos (fígado, rim e coração) e análise histológica dos mesmos.

O procedimento experimental propriamente dito foi realizado, inicialmente, com um dos cinco animais, administrando-lhe uma dose de SABO 2000mg/kg. Como o primeiro animal não morreu nem demonstrou sinais de toxicidade nas primeiras 24h, foram utilizados mais quatro animais sendo que esses receberam a mesma dose da suspensão. Ao final de 14 dias, todos os animais sobreviveram seguindo-se para a dose de 5000mg/kg.

Para o ensaio com a dose de 5000mg/kg, foi utilizado inicialmente um animal, administrando-se a referida dose. Como esse permaneceu vivo por 24h, mais dois camundongos foram adicionados ao protocolo experimental. Ao final de 14 dias, se todos os animais sobreviverem, pode-se inferir que a DL_{50} estimada é superior a dose de 5000mg/kg.

É importante destacar que, as doses descritas nesse protocolo foram administradas em intervalos de 2h, devido à suspensão possuir resíduo na sua composição, o que impossibilita as doses testadas serem dadas de uma única vez. Essa conduta é permitida, mas não pode ser ultrapassado o tempo de 24h a contar da primeira administração (OECD 425).

3.6.2 Avaliação da toxicidade oral com doses repetidas (30 e 90 dias) da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* em ratos.

Para a avaliação toxicológica, ratos *wistar* machos (150-200g) foram utilizados e divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=10): controle, SABO 200 (SABO 200mg/kg), SABO 400 (SABO 400mg/kg) e SABO 800 (SABO 800mg/kg).

De acordo com a RE nº90 (Resolução Especial) da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) os ensaios de toxicidade de longa duração ou de doses repetidas são subdivididos em experimentos de quatro semanas (30 dias de tratamento) e de doze semanas (90 dias de tratamento) (BRASIL, 2004b).

Dessa forma, os animais foram tratados uma vez ao dia por 30 dias (via oral – gavagem), e após esse período todos os grupos foram submetidos previamente a um jejum alimentar de 10-12h. Posteriormente, realizou-se coleta de sangue de todos os animais em experimentação pelo plexo orbital, utilizando-se microtubos com dois tipos de anticoagulantes, heparina sódica (parâmetros bioquímicos) e EDTA (parâmetros hematológicos). Também foram confeccionados esfregaços sanguíneos, isentos de anticoagulante, para posterior contagem diferencial dos leucócitos.

O sangue contendo heparina sódica foi então centrifugado a 3500rpm por 15min, obtendo-se o plasma a ser utilizado para as análises dos parâmetros laboratoriais bioquímicos. Os tubos contendo EDTA foram utilizados para a realização do hemograma no aparelho semi-automático (Symex® KX-21N - Roche®).

Os animais não foram sacrificados após o período de 30 dias de administração diários, sendo os mesmos tratados por mais 60 dias. Transcorridos os

90 dias, a contar do início do protocolo experimental, procedeu-se com uma nova coleta de sangue pelo plexo orbital dos animais previamente privados de alimentação por 10-12h.

Todos os procedimentos de avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos adotados para a coleta de 30 dias foram repetidos para a segunda coleta. Porém, após os 90 dias de tratamento, os órgãos rim, fígado, coração e pulmão foram retirados e analisados macroscopicamente, através da massa dos órgãos, e microscopicamente (microscópio Olympus® CX41®), mediante técnicas histológicas.

Durante todo o período de experimentação, com o objetivo de identificar os possíveis efeitos tóxicos das sementes de urucum, os animais foram acompanhados semanalmente quanto ao ganho de massa corpórea, ingestão de ração e água, utilizando-se balança apropriada (Quimis® 0-2000g).

3.6.3 Avaliação da atividade hipolipidêmica da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* em camundongos com dislipidemia induzida por triton WR-1339 (tiloxapol).

Para o estudo da dislipidemia induzida por triton WR-1339, os camundongos (25-35g) foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais (n=6): controle, triton, gemfibrozil, SABO 200, SABO 400, SABO 800.

A dislipidemia foi induzida em todos os grupos por uma única administração intraperitoneal (i.p.) de triton WR-1339 na dose de 400mg/kg (HALL *et.al.*, 2000), exceto no grupo controle negativo. Os grupos triton (salina), gemfibrozil (fármaco referência 100mg/kg), SABO 200 (SABO 200mg/kg), SABO 400 (SABO 400mg/kg) e SABO 800 (SABO 800mg/kg) foram tratados por via oral três vezes, sendo 1h antes, 22h e 46h depois da administração intraperitoneal de triton (Figura 5).

Após 24h e 48h da injeção i.p. de triton, realizou-se coleta pelo plexo orbital de todos os animais com jejum alimentar prévio de 6 a 8h. O sangue foi coletado em microtubos do tipo Eppendorf® contendo anticoagulante (heparina sódica).

O sangue foi centrifugado a 3500rpm por 15min, obtendo-se ao final o plasma a ser utilizado para as análises dos parâmetros laboratoriais bioquímicos colesterol total (CT) e triglicérides (TG).

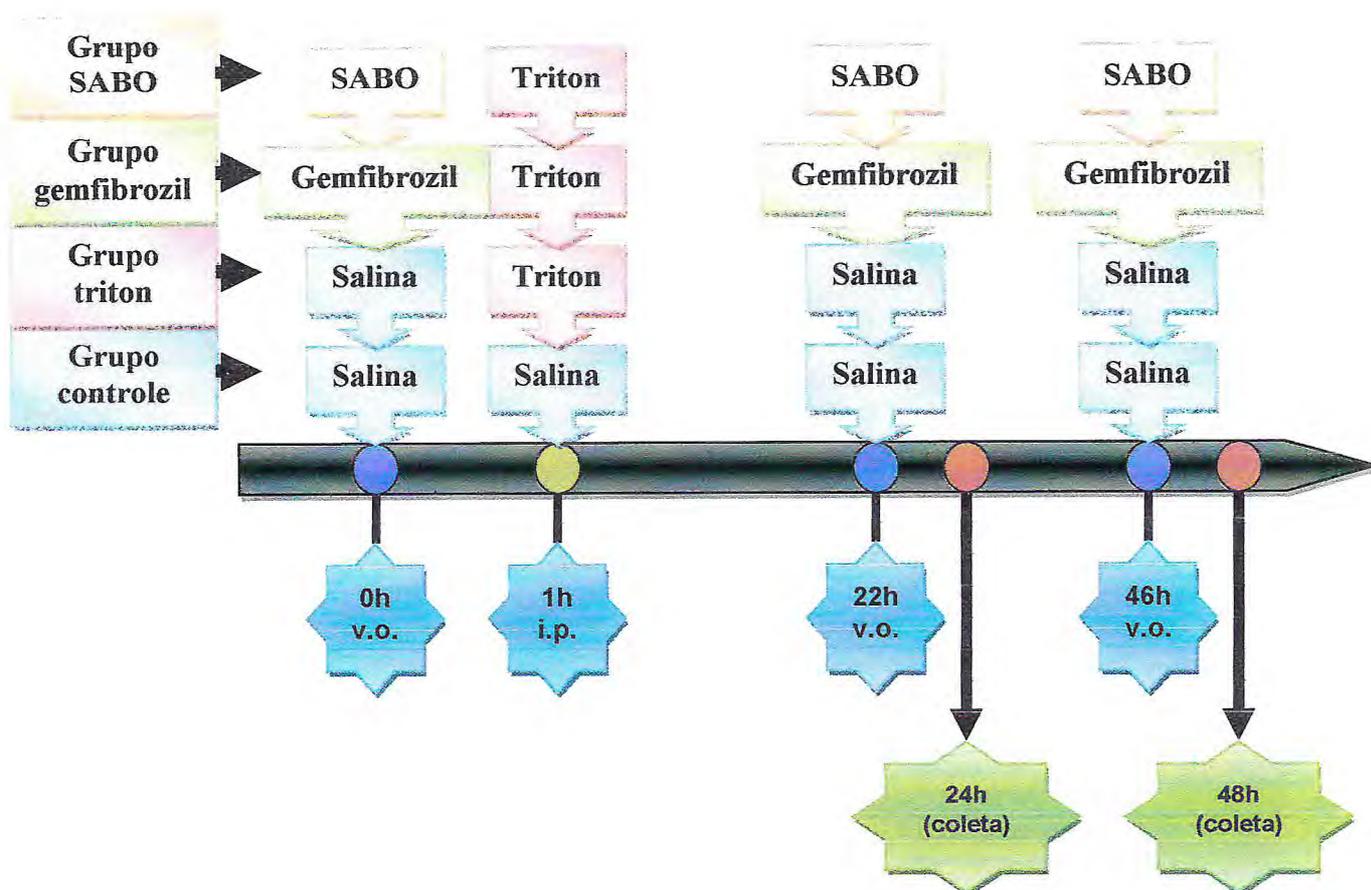


Figura 5. Esquema do delineamento experimental do protocolo de dislipidemia induzida por Triton WR-1339.

3.6.4 Avaliação da atividade hipotrigliceridemiante da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* em camundongos tratados com etanol.

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (n=6): controle, etanol, SABO 200 (SABO 200mg/kg), SABO 400 (SABO 400mg/kg) e SABO 800 (SABO 800mg/kg). Na hipertrigliceridemia induzida por etanol (SILVA, 2001), no primeiro, segundo e terceiro dias, os animais do grupo controle ingeriram água potável durante todo o dia, nos bebedouros. Em relação aos animais dos grupos etanol, SABO 200, SABO 400 e SABO 800, esses fizeram ingestão de água

potável durante o dia (período de 6h) e à noite (período de 12h) solução de etanol a 10% nos bebedouros, por três dias consecutivos. Entretanto, antes da colocação de etanol a 10% nos bebedouros no período da noite, realizava-se um jejum hídrico de 6h (Figura 6).

No segundo, terceiro e quarto dias, os animais foram tratados, por via oral (gavagem) com salina (grupos controle e etanol) ou SABO nas doses 200mg/kg, 400mg/kg, 800mg/kg, sendo que 30 minutos após esse tratamento administrava-se 0,1mL de etanol 26% (v.o., gavagem), independente do peso, para todos os grupos, exceto para o controle que recebeu salina. Todas essas administrações eram realizadas diariamente, nos mesmos horários (Figura 6).

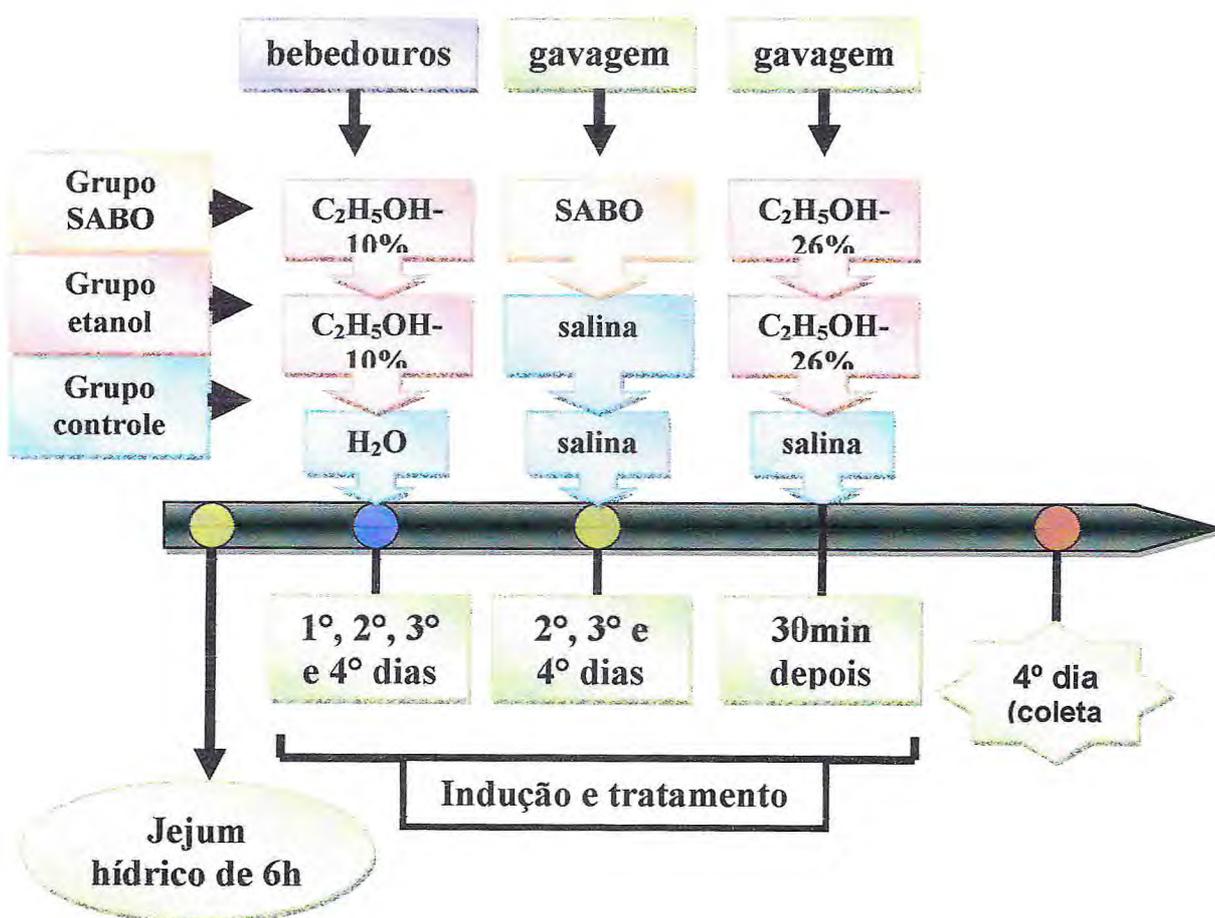


Figura 6. Esquema do delineamento experimental protocolo de dislipidemia induzida por etanol.

No quarto dia após duas horas do tratamento com salina, SABO 200, SABO 400 ou SABO 800 realizou-se nova coleta de sangue, após jejum prévio de sólidos de 6-8h (Figura 6). O sangue foi coletado em microtubos do tipo Eppendorf® contendo heparina sódica (500UI/mL) que, posteriormente, foi submetido à centrifugação para obtenção do plasma, sendo esse usado na determinação dos parâmetros CT e TG.

3.6.5 Avaliação da atividade hipolipidêmica da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* e de suas partições em camundongos com dislipidemia induzida por poloxamer-407.

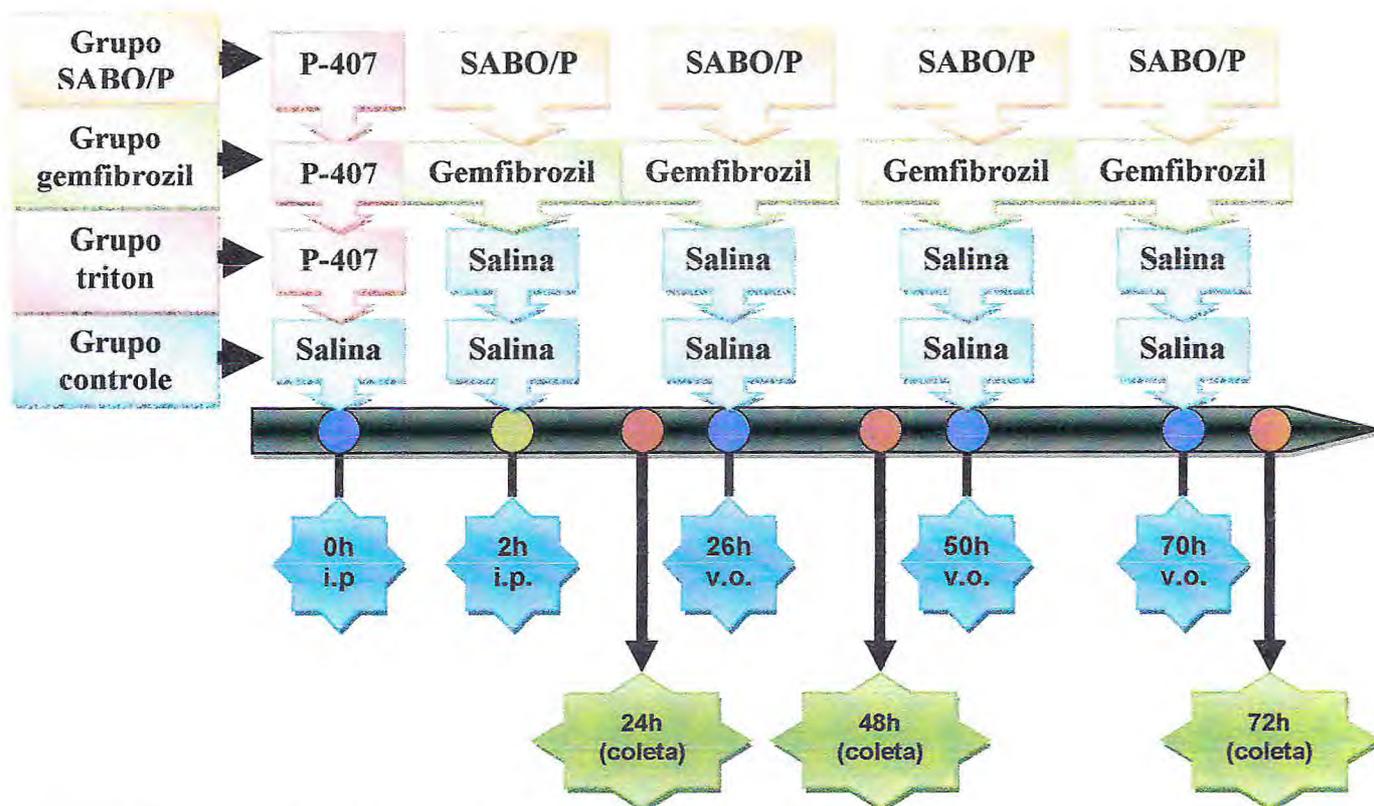
Camundongos machos, pesando entre 25 e 35g foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais (n=6): controle, poloxamer 407 (P-407), gemfibrozil, SABO 200 mg/kg (SABO 200), SABO 400mg/kg (SABO 400) e SABO 800mg/kg (SABO 800).

A hiperlipidemia foi induzida em todos os grupos por uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de poloxamer 407 (KIM *et.al.*, 2008) na dose de 1000 mg/kg, exceto no grupo controle. Os grupos P-407 (salina, v.o.), gemfibrozil (fármaco referência 100mg/kg, v.o.), SABO 200 (SABO 200mg/kg, v.o.), SABO 400 (SABO 400mg/kg, v.o.) e SABO 800 (SABO 800mg/kg, v.o.) foram tratados quatro vezes, sendo 2h, 26h, 50h e 70h depois da administração i.p. de poloxamer-407 (Figura 7).

O protocolo de dislipidemia induzida por poloxamer 407 (1000mg/kg) foi adotado para a avaliação do possível efeito hipolipidêmico das partições hexânica (HX), clorofórmica (CLO), acetato de etila (AC) e n-butanólica (N-BUT) obtidas da suspensão aquosa das sementes em estudo. Para tanto, os animais foram divididos randomicamente nos seguintes grupos experimentais (n=6): controle, P-407, veículo, HX, CLO, AC e N-BUT. A indução da dislipidemia e os tratamentos com as frações foram conduzidos como mencionado acima para a avaliação da SABO.

Após 24h, 48h e 72h da administração i.p. de P-407, realizou-se coleta de sangue pelo plexo orbital de todos os animais com jejum alimentar prévio de 6 a 8h. O sangue foi coletado em microtubos do tipo Eppendorf® contendo anticoagulante

(heparina sódica). O sangue foi centrifugado a 3500rpm por 15min, obtendo ao final o plasma a ser utilizado para as análises dos parâmetros laboratoriais bioquímicos.



SABO/P= tratamento com a suspensão ou partições.

O grupo gemfibrozil não foi incluído no protocolo relacionado ao estudo das partições.

Figura 7. Esquema do delineamento experimental protocolo de dislipidemia induzida por Poloxamer-407.

3.6.6 Avaliação da atividade hipocolesterolêmica da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* e sua partição clorofórmica em camundongos com hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.

Para a realização desse estudo, camundongos *swiss* machos foram divididos aleatoriamente em 9 grupos experimentais (n=6): controles negativo (ração padrão) e positivo (ração hipercalórica), sinvastatina (fármaco referência – 10mg/kg), SABO 200 mg/kg (SABO 200), SABO 400mg/kg (SABO 400), SABO 800mg/kg (SABO 800), CLO 2,3mg/kg (CLO 1), CLO 4,6mg/kg (CLO 2), CLO 9,2mg/kg (CLO 3).

Para o aumento nos níveis séricos de colesterol total e manutenção da elevação desse parâmetro bioquímico, todos os animais, exceto os do grupo controle negativo foram alimentados durante 6 semanas com a ração hipercolesterolêmica. A ração possuía a seguinte composição: colesterol 1% + ácido cólico 0,1% + óleo de *Cocus nucifera* 10% (WILSON *et.al.*, 2007).

A verificação da indução da hipercolesterolemia foi feita mediante coleta de sangue após jejum alimentar prévio para a determinação dos níveis de colesterol total. Após a identificação da indução da dislipidemia (duas semanas), iniciou-se o tratamento dos animais com salina, sinvastatina 10mg/kg, SABO 200, SABO 400, SABO 800, CLO 1, CLO 2 e CLO 3, por 28 dias (Figura 8). Após esse período, uma nova coleta pelo plexo orbital, após jejum alimentar de 6 a 8h, foi realizada para determinação dos parâmetros bioquímicos.

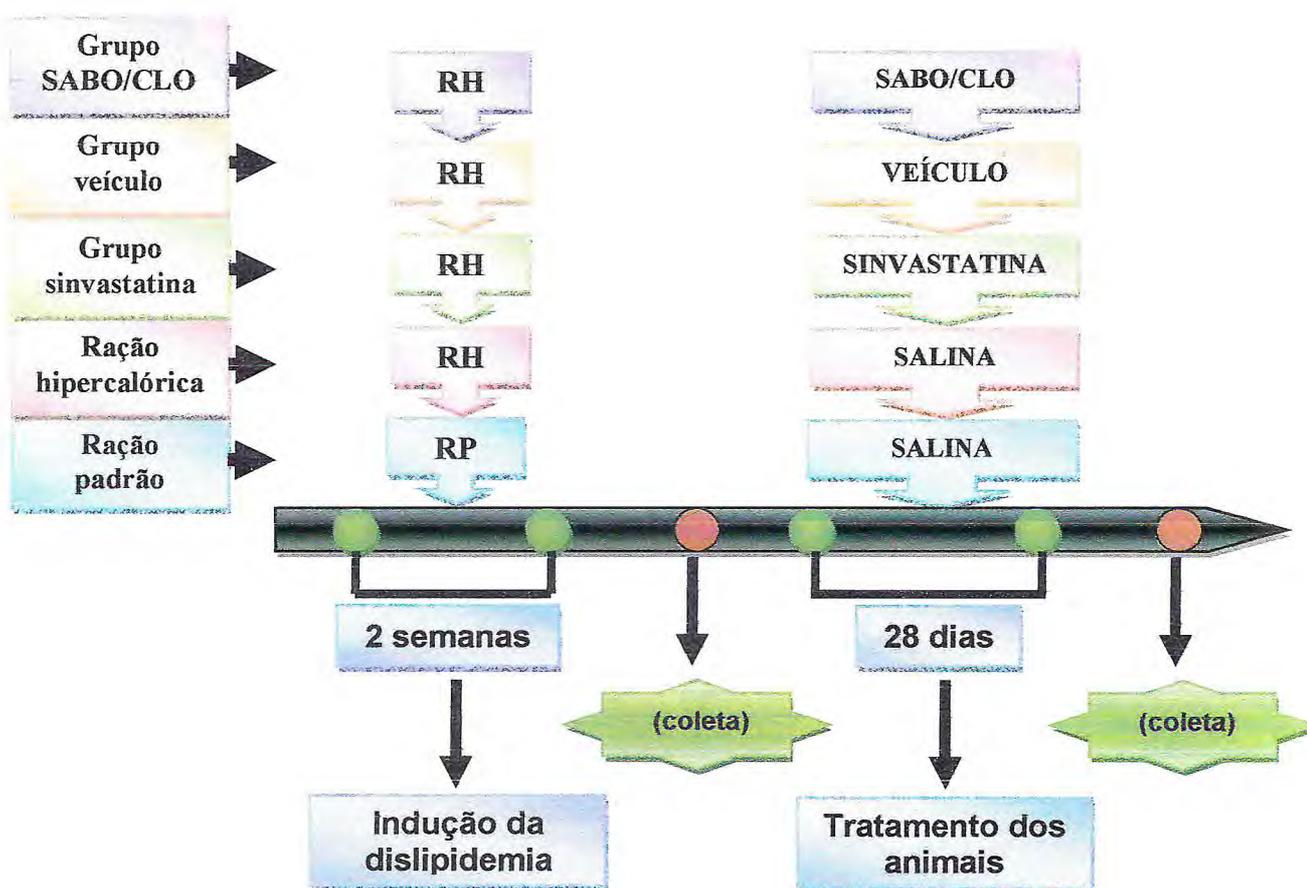


Figura 8. Esquema do delineamento experimental do protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta hipercalórica. RP = ração padrão e RH = ração hipercalórica.

3.7 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a obtenção do plasma e posterior análise dos parâmetros laboratoriais bioquímicos, cerca de 1,0-1,5mL sangue foram coletados em microtubos do tipo Ependorf® com 20µL de heparina sódica (500UI/mL). As amostras ficaram em repouso por no mínimo meia hora e no máximo 2 horas, antes da centrifugação (centrífuga Sigma® 4K15®) que foi realizada a 3500rpm, durante 15 minutos. Para tanto os camundongos foram submetidos a jejum alimentar de 6-8h, para os protocolos de dislipidemia, enquanto que para o estudo de toxicidade, os ratos foram privados de sólidos por 10-12h.

O hemograma, por sua vez, foi realizado com sangue previamente colhido em microtubos com 20µL EDTA (10g/dL) para cada mililitro de sangue. Após a coleta, o sangue foi mantido sob homogeneização para posterior análise em equipamento de hematologia.

3.8 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Após o procedimento de obtenção do plasma, procedeu-se com as determinações laboratoriais. Nos protocolos experimentais de dislipidemia com triton e etanol foram determinados os níveis séricos de triglicerídeos (TG) e colesterol total (CT). Na hiperlipidemia induzida por poloxamer 407, além dos exames citados, os parâmetros glicose, lipase e amilase foram estudados.

Em relação ao protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada, os parâmetros analisados foram glicose, CT, TG, lípase, amilase, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

No estudo da investigação toxicológica com doses repetidas da SABO foram determinados os seguintes parâmetros bioquímicos: glicose, CT, TG, colesterol-HDL, uréia, creatinina, ácido úrico, AST, ALT, fosfatase alcalina, amilase, proteínas totais, albumina além dos eletrólitos sódio, potássio e cloreto. Para a determinação dos parâmetros hematológicos, o sangue com EDTA foi cuidadosamente

homogeneizado e inserido no aparelho semi-automático (Sysmex KX-21N-Roche[®]), obtendo-se o número de hemácias, VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), hematócrito, hemoglobina, número de leucócitos e de plaquetas. O número de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, em percentual, foi obtido mediante contagem diferencial em esfregaço confeccionado e corado com a técnica panótica rápida (Instant-Pro[®] - New Prov[®]).

Os parâmetros bioquímicos foram quantificados através de técnicas enzimáticas colorimétricas com auxílio de equipamento semi-automático (Labquest[®]), utilizando-se kits diagnósticos das empresas Labtest[®] e Bioclin[®]. Os níveis séricos de eletrólitos foram determinados em eletrodo íon seletivo (Rapidchem 744[®] - Bayer[®]).

Todas as análises descritas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Clínica e no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

3.9 RETIRADA DOS ÓRGÃOS E ANÁLISES HISTOLÓGICA

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, o tórax e o abdome foram abertos, através de técnicas cirúrgicas, e os órgãos coração, pulmão, fígado e rim foram removidos e colocados em formol 10%, por 24h, para fixação.

As estruturas anatômicas obtidas foram submetidas à desidratação e diafanização, e, em seguida, cortadas, em uma espessura de 5µm. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de microscópio óptico (Olympus[®] - CX41[®]).

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

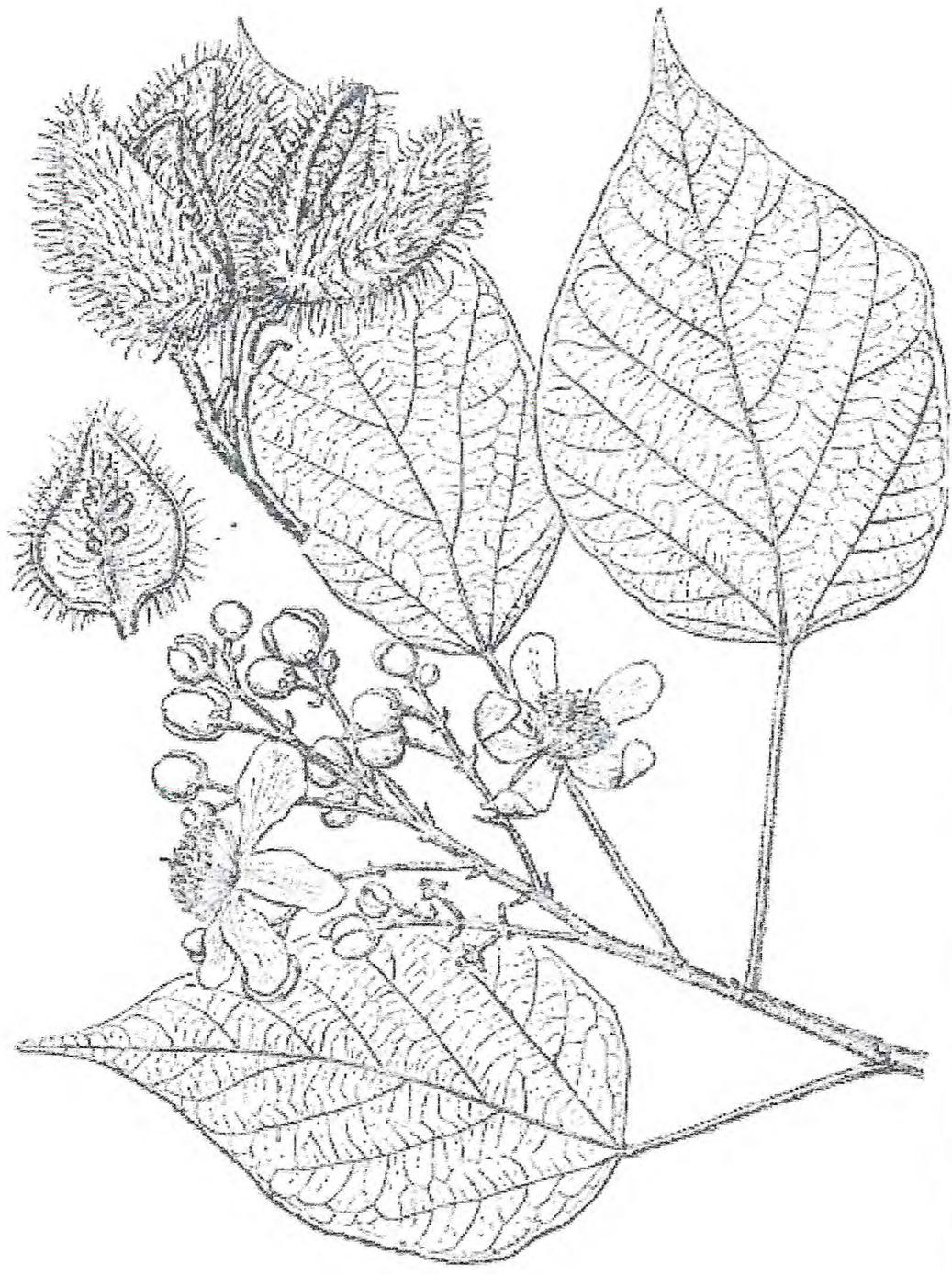
Os resultados das determinações bioquímicas e hematológicas realizadas, além dos dados relacionados ao ganho de massa corpórea, massa dos órgãos, ingestão de água e ração foram tabulados e plotados nos programas Prism 5.0 e Microsoft Office Excel 2007[®] para análise estatística e geração de gráficos.

Os valores obtidos foram expressos em média \pm erro padrão médio (E.P.M.). Para comparação entre as médias utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey ou Newman-keuls. O critério de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3.11 APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

Todos os procedimentos adotados para a realização dos protocolos experimentais descritos estavam de acordo com os preceitos éticos adotados pela comunidade científica nacional e internacional.

De acordo com as normas exigidas para estudos com animais, os protocolos foram devidamente submetidos à Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, sendo aprovados em 11 de abril de 2007 com o número de protocolo 048/07.



**R
E
S
U
L
T
A
D
O
S**

4. RESULTADOS

4.1 PROTOCOLO DE TOXICIDADE ORAL AGUDA PELO TESTE DO *Up-and-Down*

Após 14 dias da administração de SABO 2000mg/kg, verificou-se que nenhum dos cinco camundongos utilizados morreu ou manifestou sinais de toxicidade, tais como alterações de pêlo, pele e mucosas, comportamento, convulsões, diarreia, letargia e coma. Além disso, não foram visualizadas alterações sugestivas de degeneração visíveis à microscopia óptica mediante análise histológica dos órgãos rins, fígado e coração.

Devido à ausência de toxicidade com a dose de 2000mg/kg, procedeu-se com o segundo teste que foi realizado mediante tratamento com SABO 5000mg/kg. Nos três animais utilizados para avaliação da toxicidade aguda dessa dose maior, não foram identificadas mortes nem os sinais tóxicos descritos, o que indica que provavelmente a suspensão em estudo seja atóxica a curto prazo, sendo sua DL_{50} estimada provavelmente maior que 5000mg/kg. Na análise histológica dos órgãos mencionados acima, também não foram visualizadas alterações significativas.

Esses achados foram de grande importância para a realização do teste de toxicidade de doses repetidas por 30 e 90 dias como preconizado pela ANVISA (RE nº 90), proporcionando uma maior segurança, de modo a não conferir dor nem sofrimento aos animais em experimentação.

4.2 PROTOCOLOS DE TOXICIDADE ORAL DE DOSES REPETIDAS POR 30 E 90 DIAS

4.2.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

O tratamento diário dos ratos com a SABO, por 30 e 90 dias, nas doses de 200mg/kg, 400mg/kg ou 800mg/kg promoveu alterações significantes em alguns dos parâmetros bioquímicos avaliados.

A dose de 800mg/kg aumentou os níveis plasmáticos de glicose após 30 dias de tratamento ($131,5 \pm 2,54\text{mg/dL}$ vs. $111,7 \pm 2,53\text{mg/dL}$ – tabela 1) quando comparado com o grupo controle. Esse aumento, em percentual, foi de 17,7% (figura 9).

Após 90 dias, os valores de glicose permaneceram elevados no grupo tratado com SABO 800 ($144,1 \pm 9,55\text{mg/dL}$) ao se correlacionar com os grupos SABO 400 ($117,9 \pm 4,14\text{mg/dL}$) e controle ($112,5 \pm 7,21\text{mg/dL}$) (tabela 2). Em percentual esse aumento foi de 28,1% e 22,2%, quando comparado ao controle e SABO 400, respectivamente (figura 10).

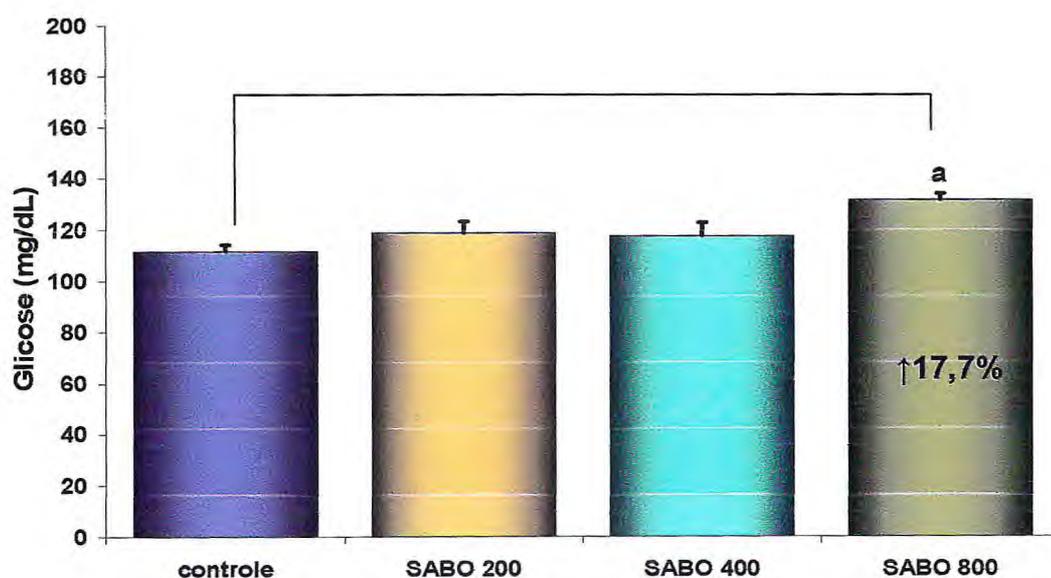


Figura 9. Níveis plasmáticos de glicose após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA e teste de Tukey).

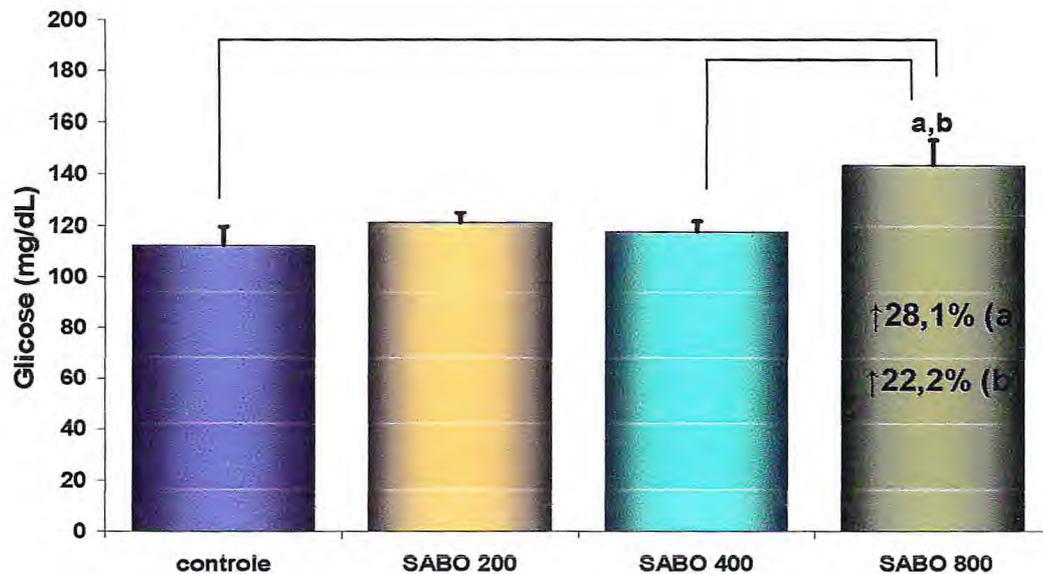


Figura 10. Níveis plasmáticos de glicose após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo SABO 400 (ANOVA e teste de Tukey).

Em relação aos parâmetros bioquímicos correlacionados ao metabolismo lipídico como colesterol total, triglicérides e colesterol-HDL (tabela 1 e tabela 2); os de função renal: uréia, creatinina e ácido úrico (tabela 3 e tabela 4), bem como os do metabolismo protéico (proteínas totais e albumina – tabela 5 e tabela 6) não foram alterados de forma significativa entre os grupos estudados durante ambos os períodos de experimentação.

Tabela 1. Níveis plasmáticos de glicose, colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA e teste de Tukey).

Parâmetros bioquímicos	Grupos experimentais			
	Controle	SABO 200	SABO 400	SABO 800
Glicose (mg/dL)	111,7 \pm 2,53	118,8 \pm 4,43	117,6 \pm 5,09	\uparrow 131,5 \pm 2,54 ^a
Colesterol Total (mg/dL)	81,2 \pm 3,48	73,6 \pm 3,75	80,9 \pm 3,50	73,2 \pm 3,31
Colesterol HDL (mg/dL)	58,3 \pm 3,26	55,2 \pm 2,70	55,4 \pm 1,60	54,6 \pm 5,13
Triglicerídeos (mg/dL)	174,9 \pm 23,77	133,4 \pm 15,64	156,4 \pm 14,22	202,1 \pm 15,20

Tabela 2. Níveis plasmáticos de glicose, colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo SABO 400 (ANOVA e teste de Tukey).

Parâmetros bioquímicos	Grupos experimentais			
	Controle	SABO 200	SABO 400	SABO 800
Glicose (mg/dL)	112,5 \pm 7,21	121,2 \pm 3,91	117,9 \pm 4,14	\uparrow 144,1 \pm 9,55 ^{a, b}
Colesterol Total (mg/dL)	91,5 \pm 5,42	84,1 \pm 4,59	89,0 \pm 3,28	81,3 \pm 4,03
Colesterol HDL (mg/dL)	59,2 \pm 3,93	56,6 \pm 2,89	60,9 \pm 2,91	57,8 \pm 3,38
Triglicerídeos (mg/dL)	159,3 \pm 25,49	111,8 \pm 12,78	157,9 \pm 17,09	177,2 \pm 22,47

Tabela 3. Níveis plasmáticos de uréia, creatinina e ácido úrico após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg. (ANOVA e teste de Tukey).

Parâmetros bioquímicos	Grupos experimentais			
	Controle	SABO 200	SABO 400	SABO 800
Uréia (mg/dL)	41,3 \pm 2,19	43,1 \pm 1,87	43,0 \pm 2,56	42,1 \pm 1,86
Creatinina (mg/dL)	0,94 \pm 0,06	0,82 \pm 0,04	0,83 \pm 0,06	0,89 \pm 0,06
Ácido úrico (mg/dL)	0,25 \pm 0,02	0,24 \pm 0,03	0,27 \pm 0,02	0,26 \pm 0,03

Tabela 4. Níveis plasmáticos de uréia, creatinina e ácido úrico após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg. (ANOVA e teste de Tukey).

Parâmetros bioquímicos	Grupos experimentais			
	Controle	SABO 200	SABO 400	SABO 800
Uréia (mg/dL)	35,3 \pm 1,30	37,90 \pm 1,93	38,10 \pm 1,22	34,40 \pm 1,14
Creatinina (mg/dL)	0,71 \pm 0,03	0,72 \pm 0,02	0,66 \pm 0,02	0,65 \pm 0,02
Ácido úrico (mg/dL)	0,68 \pm 0,07	0,64 \pm 0,06	0,63 \pm 0,06	0,72 \pm 0,08

Tabela 5. Níveis plasmáticos de proteínas totais e albumina após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg (ANOVA e teste de Tukey).

Parâmetros bioquímicos	Grupos experimentais			
	Controle	SABO 200	SABO 400	SABO 800
Proteínas Totais (g/dL)	6,89 \pm 0,07	6,72 \pm 0,06	6,81 \pm 0,06	6,76 \pm 0,09
Albumina (g/dL)	3,24 \pm 0,06	3,12 \pm 0,03	3,17 \pm 0,04	3,10 \pm 0,05

Tabela 6. Níveis plasmáticos de proteínas totais e albumina após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg. (ANOVA e teste de Tukey).

Parâmetros bioquímicos	Grupos experimentais			
	Controle	SABO 200	SABO 400	SABO 800
Proteínas Totais (g/dL)	7,62 \pm 0,19	7,54 \pm 0,13	7,84 \pm 0,24	7,21 \pm 0,19
Albumina (g/dL)	2,83 \pm 0,05	2,86 \pm 0,03	2,77 \pm 0,07	2,89 \pm 0,07

Após o período de tratamento por 30 dias, os parâmetros relacionados com a função hepática como AST (51,3 \pm 2,26U/L vs. 61,3 \pm 1,73U/L), ALT (27,4 \pm 1,71 U/L vs. 33,5 \pm 1,64U/L) e fosfatase alcalina (82,8 \pm 6,10U/L vs. 159,8 \pm 10,07U/L) do grupo tratado com SABO 800mg/kg, demonstraram uma redução significativa em relação ao grupo controle (tabela 7). Tais decréscimos em percentual foram de

16,3% (figura 11), 18,2% (figura 13) e 48,1% (figura 15), para AST, ALT e fosfatase alcalina, respectivamente.

Além disso, nesse mesmo período, foram encontradas reduções de fosfatase alcalina com a dose de 200mg/kg ($110,9 \pm 6,80$ U/L) e 400mg/kg ($94,8 \pm 5,18$ U/L) de SABO, se comparadas ao grupo controle ($159,8 \pm 10,07$ U/L), que correspondem à diminuição percentual de 30,6% e 40,4%, respectivamente (Figura 15).

O parâmetro bioquímico AST do grupo tratado com SABO 800mg/kg ($47,1 \pm 2,46$ U/L vs. $58,5 \pm 3,50$ U/L) e SABO 400mg/kg ($47,9 \pm 2,50$ U/L vs. $58,5 \pm 3,50$ U/L), apresentaram uma redução significativa em relação ao grupo controle (tabela 8), após administração diária por 90 dias. Em termos percentuais, as reduções de AST foram em 19,5% para os grupos tratados com SABO 400 e 18,2% para SABO 800 (figura 12).

Ainda no período mais longo de tratamento, ou seja, 90 dias, a fosfatase alcalina dos grupos SABO 800mg/kg ($33,3 \pm 1,54$ U/L vs. $40,8 \pm 1,15$ U/L), SABO 400mg/kg ($33,8 \pm 1,06$ U/L vs. $40,8 \pm 1,15$ U/L) e SABO 200mg/kg ($32,0 \pm 1,65$ U/L vs. $40,8 \pm 1,15$ U/L) foi reduzida significativamente em relação ao controle (tabela 8). A diminuição promovida pela suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* foi em 21,5% para os grupos tratados com SABO 200mg/kg, 17,2% para SABO 400mg/kg e 18,4% para SABO 800mg/kg (figura 16).

Em relação aos níveis plasmáticos de amilase, não foram visualizadas alterações, de forma significativa, em nenhum dos grupos nos períodos de tratamento estudados (tabela 7 e tabela 8).

Verifica-se que as diferenças encontradas nos parâmetros bioquímicos dos grupos tratados com SABO em relação ao grupo controle foram as mesmas para os períodos de tratamento de 30 e 90 dias. Para o parâmetro ALT, encontrou-se redução significativa em relação ao grupo controle somente para 30 dias de tratamento, retornando aos níveis basais do controle após 90 dias.

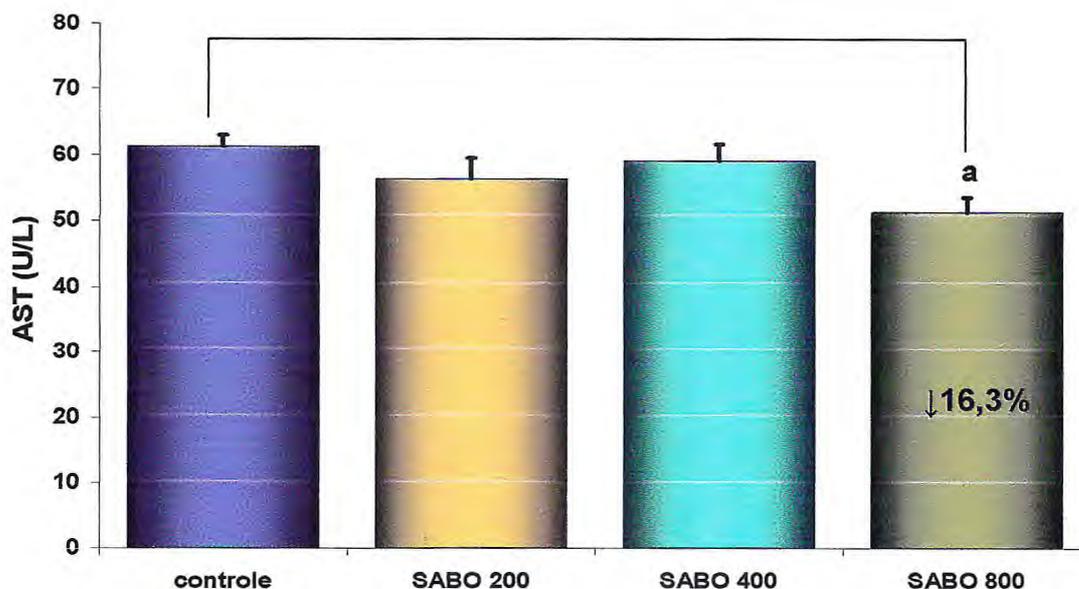


Figura 11. Níveis plasmáticos de AST após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA e teste de Tukey).

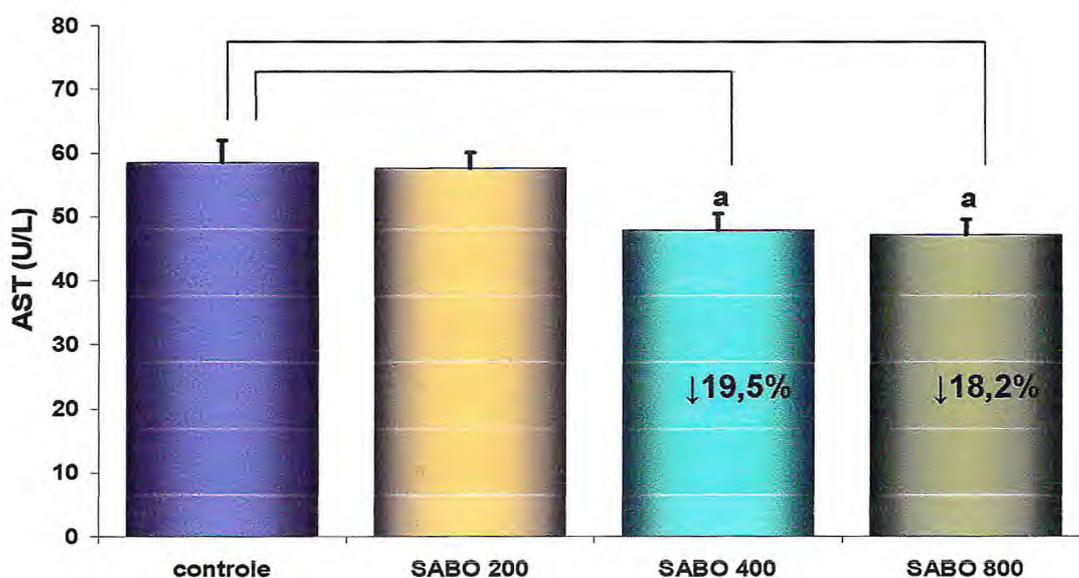


Figura 12. Níveis plasmáticos de AST após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA e teste de Tukey).

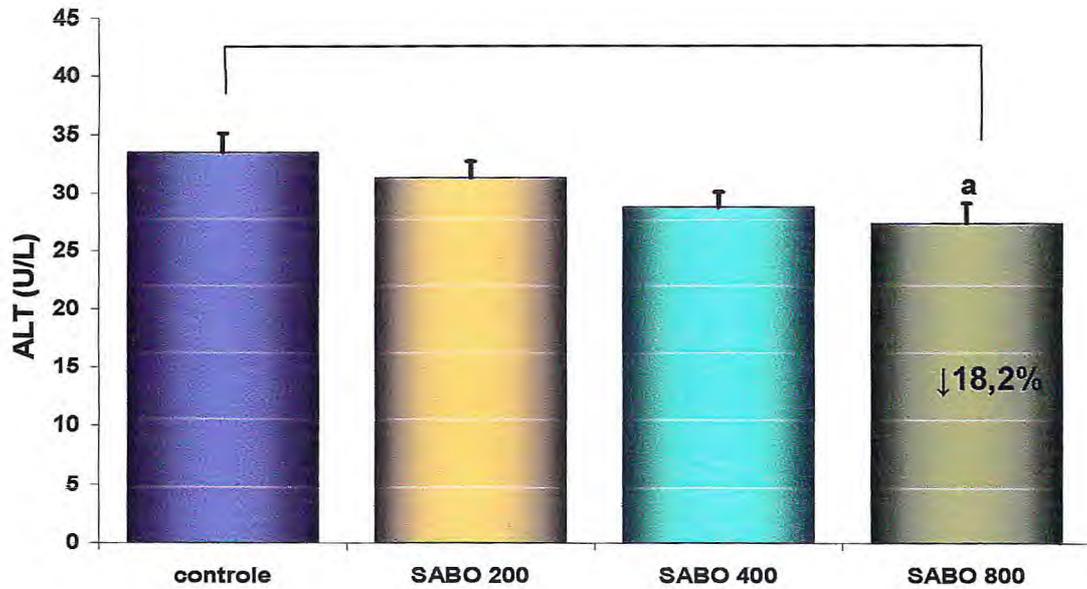


Figura 13. Níveis plasmáticos de ALT após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média ± erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA e teste de Tukey).

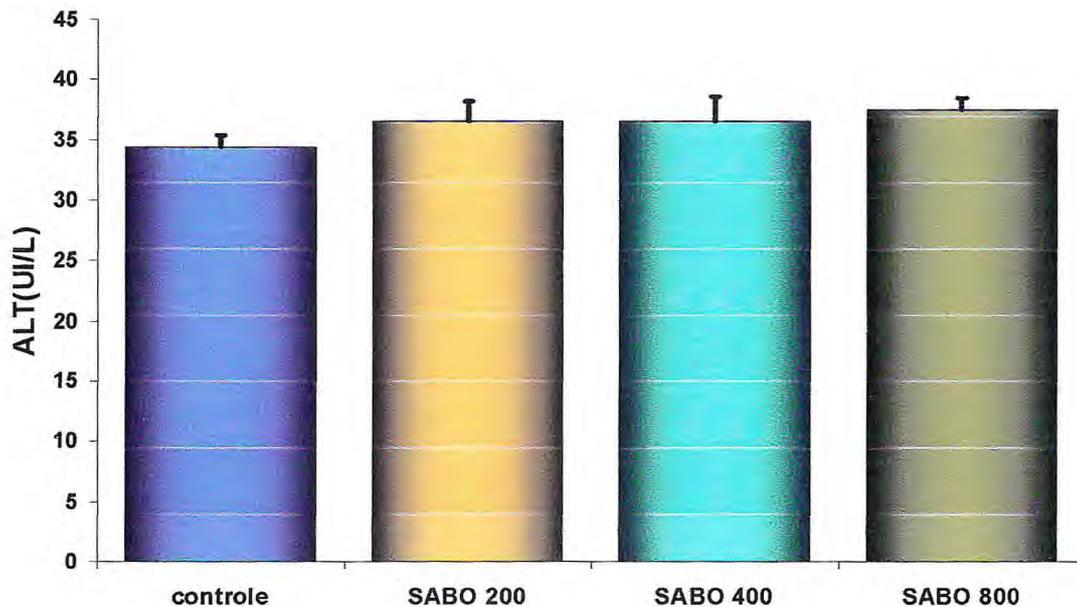


Figura 14. Níveis plasmáticos de ALT após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média ± erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg (ANOVA e teste de Tukey).

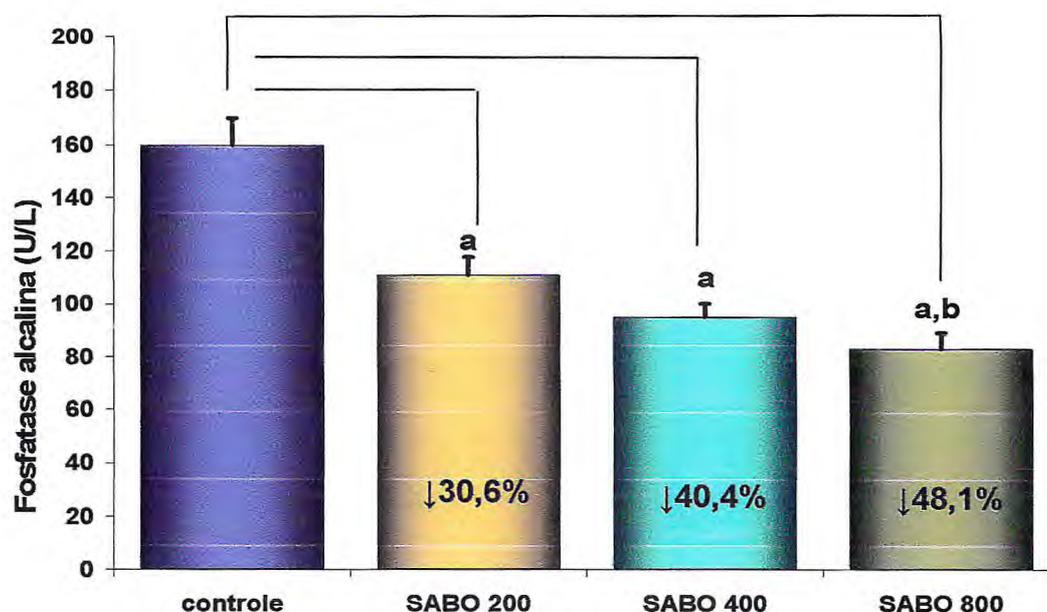


Figura 15. Níveis plasmáticos de fosfatase alcalina após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao SABO 200 (ANOVA e teste de Tukey).

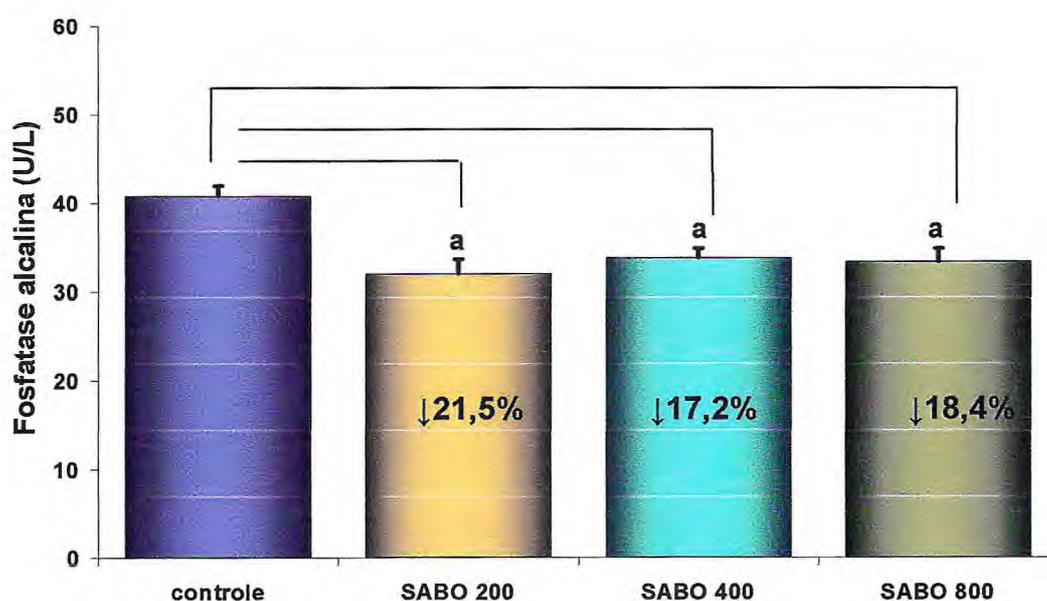


Figura 16. Níveis plasmáticos de fosfatase alcalina após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA e teste de Tukey)

Tabela 7. Níveis plasmáticos de AST, ALT, fosfatase alcalina e amilase após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo SABO 200 (ANOVA e teste de Tukey).

Parâmetros bioquímicos	Grupos experimentais			
	Controle	SABO 200	SABO 400	SABO 800
AST (U/L)	61,3 \pm 1,73	56,3 \pm 3,15	59,0 \pm 2,53	↓51,3 \pm 2,26 ^a
ALT (U/L)	33,5 \pm 1,64	31,3 \pm 1,44	28,8 \pm 1,31	↓27,4 \pm 1,71 ^a
Fosfatase alcalina (U/L)	159,8 \pm 10,07	↓110,9 \pm 6,80 ^a	↓94,8 \pm 5,18 ^a	↓82,8 \pm 6,10 ^{a, b}
Amilase (U/L)	734,6 \pm 7,30	743,2 \pm 5,63	734,3 \pm 3,37	727,4 \pm 3,99

Tabela 8. Níveis plasmáticos de AST, ALT, fosfatase alcalina e amilase após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. (ANOVA e teste de Tukey).

Parâmetros bioquímicos	Grupos experimentais			
	Controle	SABO 200	SABO 400	SABO 800
AST (U/L)	58,5 \pm 3,50	57,6 \pm 2,46	↓47,9 \pm 2,50 ^a	↓47,1 \pm 2,46 ^a
ALT (U/L)	34,4 \pm 0,96	36,5 \pm 1,66	36,5 \pm 2,12	37,5 \pm 0,95
Fosfatase alcalina (U/L)	40,8 \pm 1,15	↓32,0 \pm 1,65 ^a	↓33,8 \pm 1,06 ^a	↓33,3 \pm 1,54 ^a
Amilase (U/L)	755,3 \pm 6,21	754,6 \pm 3,48	748,0 \pm 4,04	749,9 \pm 4,60

Os níveis plasmáticos dos eletrólitos analisados no presente estudo – sódio, potássio e cloreto – não foram modificados significativamente ($p>0,05$) após a administração da SABO nas doses de 200mg/kg, 400 mg/kg, 800mg/kg ou salina (controle), durante os períodos de 30 (tabela 9) e 90 dias (tabela 10).

Tabela 9. Níveis plasmáticos de sódio, potássio e cloreto após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais ($n=10$) foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg (ANOVA e teste de Tukey).

Parâmetros bioquímicos	Grupos experimentais			
	Controle	SABO 200	SABO 400	SABO 800
Sódio (mmol/L)	149,1 \pm 1,09	147,4 \pm 0,43	148,5 \pm 0,57	147,1 \pm 0,71
Potássio (mmol/L)	2,74 \pm 0,04	2,88 \pm 0,03	2,90 \pm 0,08	2,94 \pm 0,08
Cloreto (mmol/L)	104,5 \pm 0,70	104,9 \pm 0,47	106,3 \pm 0,53	106,6 \pm 0,51

Tabela 10. Níveis plasmáticos de sódio, potássio e cloreto após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais ($n=10$) foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg. (ANOVA e teste de Tukey).

Parâmetros bioquímicos	Grupos experimentais			
	Controle	SABO 200	SABO 400	SABO 800
Sódio (mmol/L)	147,7 \pm 1,37	149,1 \pm 0,67	150,3 \pm 0,42	150,7 \pm 0,48
Potássio (mmol/L)	2,96 \pm 0,07	2,91 \pm 0,02	3,03 \pm 0,04	3,09 \pm 0,05
Cloreto (mmol/L)	107,0 \pm 0,72	107,5 \pm 1,94	109,0 \pm 0,30	109,1 \pm 0,64

4.2.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Os índices hematimétricos analisados tais como VCM, HCM e CHCM, além dos parâmetros hemoglobina, hematócrito, número de hemácias, leucócitos e plaquetas não foram alterados ($p > 0,05$) pela administração diária por 30 (tabela 11) e 90 dias (tabela 12) de SABO nas doses 200mg/kg, 400mg/kg ou 800mg/kg.

Tabela 11. Parâmetros hematológicos após tratamento por 30 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg, VCM = Volume Corpuscular Médio, HCM = Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (ANOVA e teste de Tukey).

Parâmetros hematológicos	Grupos experimentais			
	Controle	SABO 200	SABO 400	SABO 800
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	7,52 \pm 0,06	7,60 \pm 0,07	7,70 \pm 0,12	7,56 \pm 0,08
Hemoglobina (g/dL)	14,66 \pm 0,08	14,55 \pm 0,09	14,49 \pm 0,26	14,33 \pm 0,12
Hematócrito (%)	46,29 \pm 1,44	44,72 \pm 0,35	44,94 \pm 0,67	44,57 \pm 0,34
VCM (fL)	55,75 \pm 4,07	58,88 \pm 0,34	58,69 \pm 0,34	58,97 \pm 0,36
HCM (pg)	19,49 \pm 0,13	19,17 \pm 0,14	18,97 \pm 0,19	18,96 \pm 0,17
CHCM (g/dL)	32,66 \pm 0,19	32,55 \pm 0,10	32,27 \pm 0,16	32,15 \pm 0,11
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	7,64 \pm 0,53	8,95 \pm 0,35	8,52 \pm 0,59	9,21 \pm 0,71
Neutrófilos (%)	5,70 \pm 0,37	5,70 \pm 0,34	6,70 \pm 0,42	6,50 \pm 0,40
Eosinófilos (%)	0,60 \pm 0,27	0,70 \pm 0,30	1,00 \pm 0,21	1,20 \pm 0,25
Linfócitos (%)	91,20 \pm 0,76	89,80 \pm 0,53	89,00 \pm 0,59	88,00 \pm 0,70
Monócitos (%)	2,80 \pm 0,47	3,80 \pm 0,51	3,50 \pm 0,40	4,20 \pm 0,33
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	945,10 \pm 34,66	888,10 \pm 59,36	840,70 \pm 58,02	1018,00 \pm 18,80

Além disso, analisando-se as lâminas dos esfregaços sanguíneos confeccionadas, não foram observadas alterações degenerativas das células em estudo, que foram: hemácias, leucócitos, plaquetas, linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos.

Tabela 12. Parâmetros hematológicos após tratamento por 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) ou água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg. SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg, VCM = Volume Corpuscular Médio, HCM = Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (ANOVA e teste de Tukey).

Parâmetros hematológicos	Grupos experimentais			
	Controle	SABO 200	SABO 400	SABO 800
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	7,90 \pm 0,19	7,84 \pm 0,21	7,99 \pm 0,07	7,84 \pm 0,11
Hemoglobina (g/dL)	14,15 \pm 0,25	14,19 \pm 0,32	14,41 \pm 0,15	14,32 \pm 0,14
Hematócrito (%)	4,62 \pm 0,94	43,41 \pm 1,14	43,66 \pm 0,35	43,40 \pm 0,56
VCM (fL)	55,11 \pm 0,33	55,35 \pm 0,25	54,60 \pm 0,33	55,41 \pm 0,41
HCM (pg)	17,94 \pm 0,19	18,13 \pm 0,18	18,00 \pm 0,17	18,29 \pm 0,21
CHCM (g/dL)	32,56 \pm 0,28	32,71 \pm 0,22	32,90 \pm 0,16	33,03 \pm 0,21
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	7,28 \pm 0,50	7,08 \pm 0,50	8,42 \pm 0,20	7,95 \pm 0,35
Neutrófilos (%)	9,10 \pm 0,94	8,50 \pm 1,34	12,20 \pm 1,45	12,20 \pm 1,94
Eosinófilos (%)	0,90 \pm 0,31	0,60 \pm 0,34	0,80 \pm 0,25	1,10 \pm 0,35
Linfócitos (%)	86,40 \pm 1,29	87,80 \pm 1,51	82,30 \pm 1,33	83,70 \pm 1,84
Monócitos (%)	3,50 \pm 0,58	3,30 \pm 0,45	4,00 \pm 0,76	3,00 \pm 0,63
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	980,70 \pm 40,54	949,80 \pm 33,32	1017,00 \pm 28,27	1044,00 \pm 33,06

4.2.3 Medição e análise da massa corporal, massa dos órgãos, ingestão de ração e água.

4.2.3.1 Avaliação da massa corporal

A administração diária de SABO, por via oral, nas doses em estudo, durante o período de 30 e 90 dias não promoveu alterações significativas na massa corporal dos animais quando comparados ao grupo controle (figura 17). Ressalta-se que o declínio apresentado na semana 5 é referente a coleta realizada após 30 dias de tratamento, entretanto o ganho de massa corporal dos animais foi recuperado nas semanas posteriores.

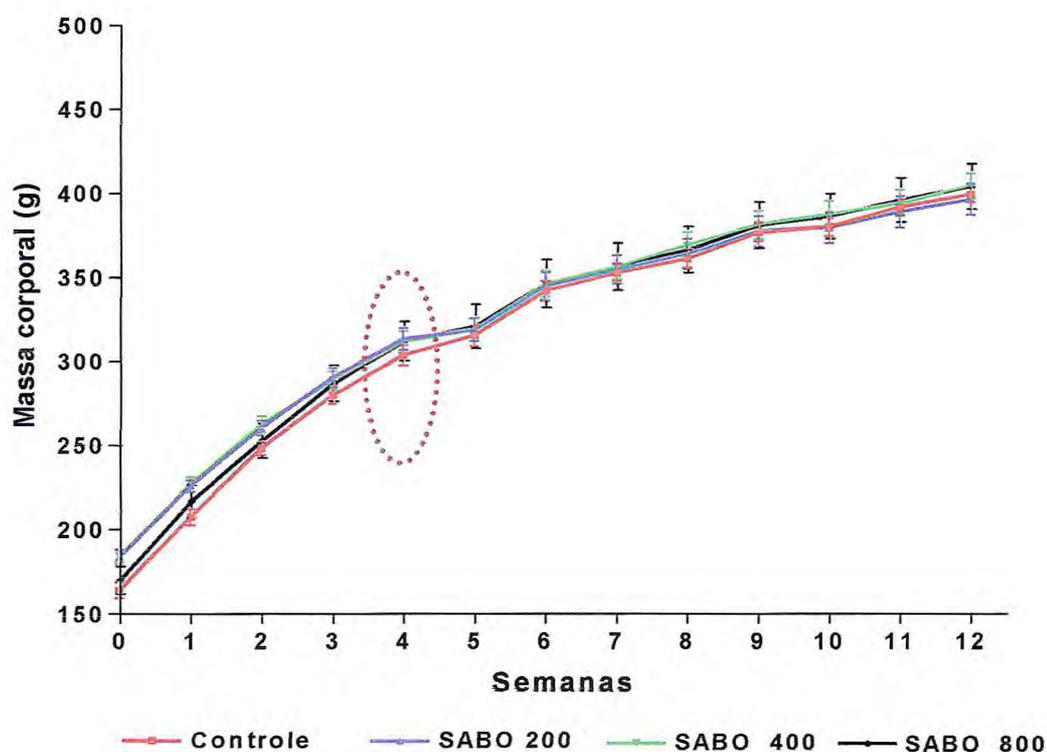


Figura 17. Massa corporal dos grupos experimentais, em gramas, após tratamento por 30 e 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) e água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais ($n=10$) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg. Destacou-se com círculo pontilhado um declínio de ganho de massa corpórea (ANOVA e teste de Tukey).

4.2.3.2 Avaliação da ingestão de água e ração

Ao longo de todo o período de experimentação, não foram identificadas diferenças significativas de ingestão de água (figura 18) nem de ração (figura 19) nos grupos tratados com a suspensão aquosa de *Bixa orellana* nas doses 200mg/kg, 400mg/kg ou 800mg/kg, quando comparados com o grupo controle.

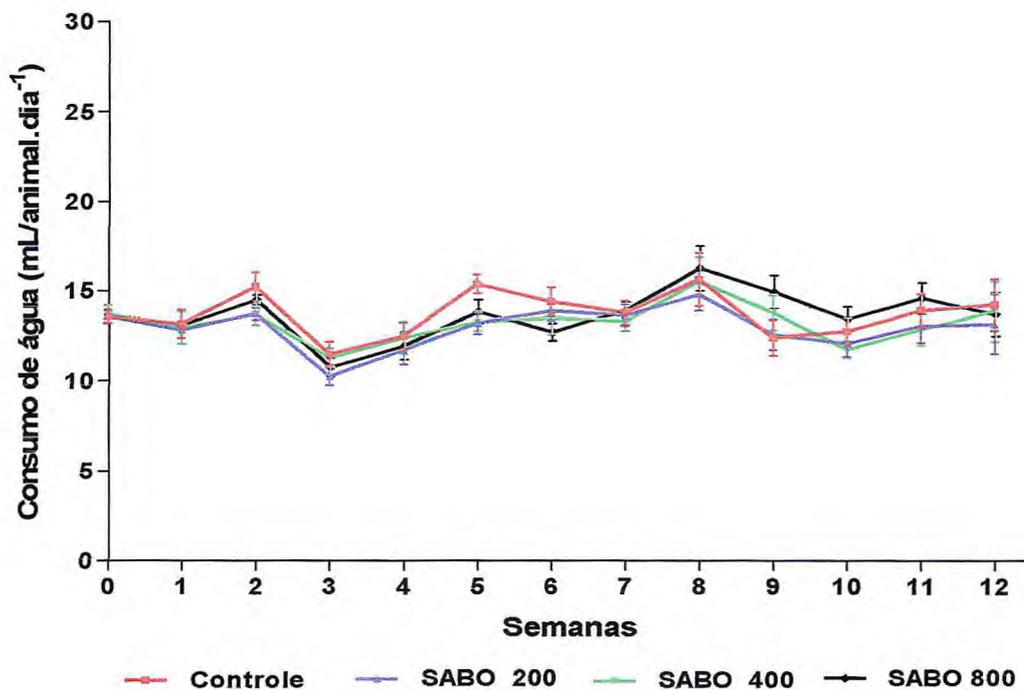


Figura 18. Consumo de água dos grupos experimentais, em mililitros, após tratamento por 30 e 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) e água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg (ANOVA e teste de Tukey).

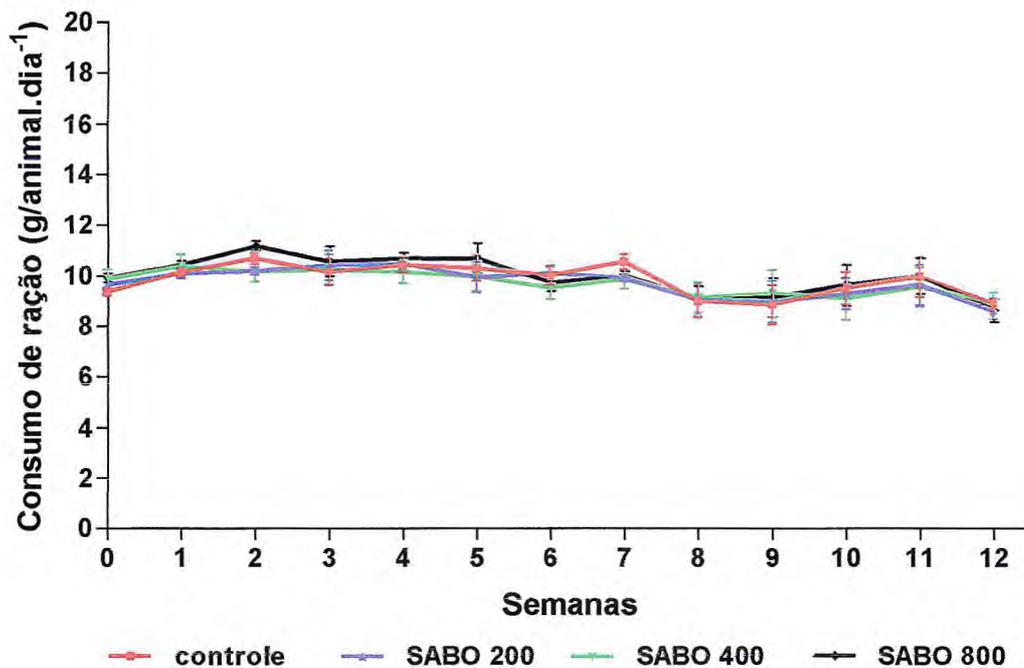


Figura 19. Consumo de ração dos grupos experimentais, em gramas, após tratamento por 30 e 90 dias com suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) e água potável (controle). Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM) onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg. (ANOVA e teste de Tukey).

4.2.3.3 Avaliação da massa dos órgãos

Ao final dos experimentos relacionados ao estudo da toxicidade oral de doses repetidas com a suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana*, foram analisados macroscopicamente e microscopicamente os órgãos coração, fígado, rim e pulmão.

Após essa análise, verificou-se que não houve diferença nem em relação à massa (tabela 13) dessas estruturas anatômicas, nem ao aspecto macroscópico delas nos grupos experimentais estudados.

Tabela 13. Massa dos órgãos, em gramas, dos grupos controle, SABO 200, SABO 400 e SABO 800, após 90 dias de tratamento. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg. SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg (ANOVA - Tukey).

Órgãos	Grupos experimentais			
	Controle	SABO 200	SABO 400	SABO 800
Coração (g)	1,31 \pm 0,09	1,39 \pm 0,07	1,15 \pm 0,05	1,14 \pm 0,04
Pulmão (g)	0,74 \pm 0,06	0,66 \pm 0,03	0,71 \pm 0,05	0,62 \pm 0,03
Rim (g)	1,12 \pm 0,06	1,07 \pm 0,04	1,17 \pm 0,03	1,11 \pm 0,04
Fígado (g)	10,65 \pm 0,25	10,30 \pm 0,26	10,8 \pm 0,37	10,29 \pm 0,44

4.2.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS ÓRGÃOS

CORAÇÃO

De acordo com as análises das lâminas oriundas dos animais dos grupos controle, SABO 200, SABO 400 e SABO 800, não foram visualizadas alterações nas estruturas histológicas do tecido cardíaco.

Demonstram-se, nas microfotografias representativas das estruturas, as fibras íntegras do tecido muscular estriado cardíaco sem nenhum tipo de alteração. Essas constatações podem ser visualizadas nas figuras 20 e 21, como apresentado a seguir.

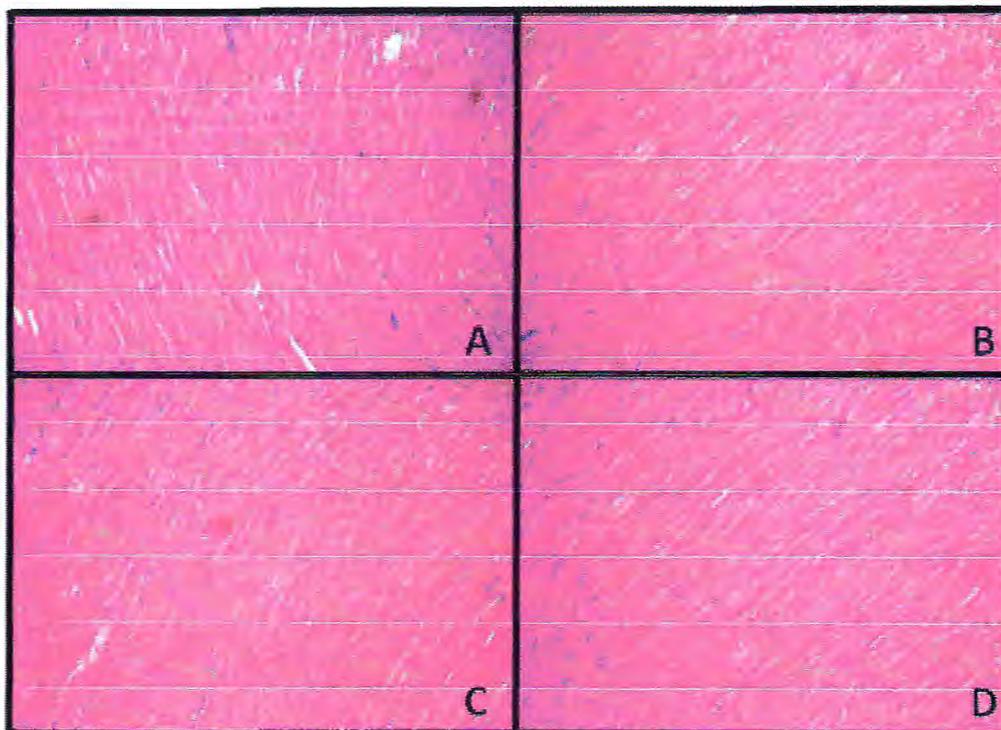


Figura 20. Microfotografia representativa no aumento de 200X do tecido muscular estriado cardíaco dos grupos controle (A), SABO 200 (B), SABO 400 (C) e SABO 800 (D); onde SABO 200 = SABO 200mg/kg. SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg. Fotografia realizada em microscópio ótico Olympus® CX41® - aumento de 200X utilizando máquina fotográfica digital Nikon® L14®.

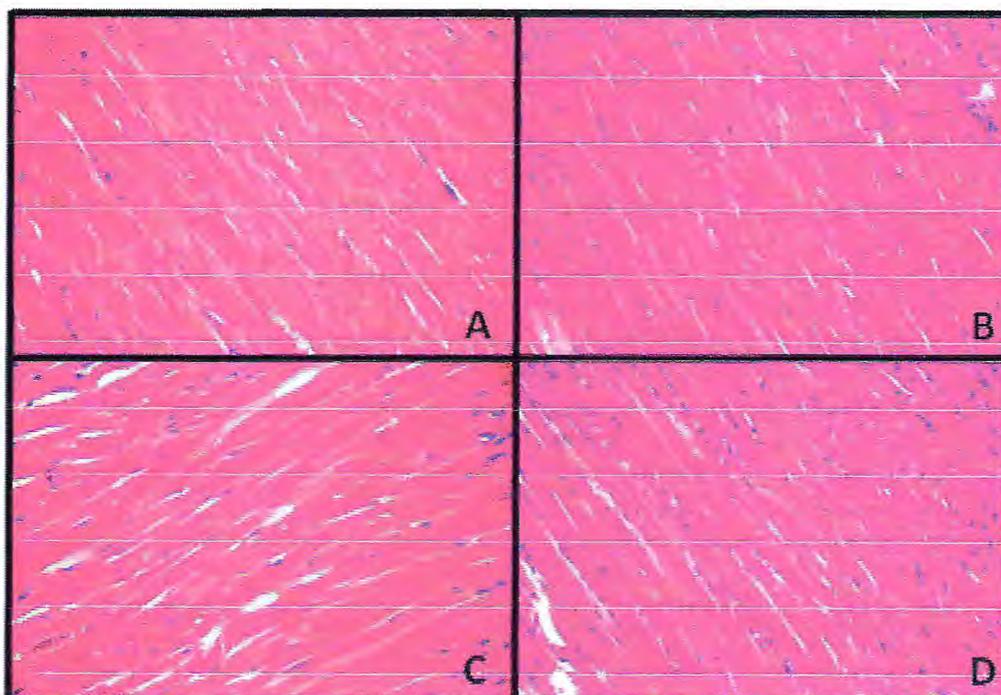


Figura 21. Microfotografia representativa no aumento de 400X do tecido muscular estriado cardíaco dos grupos controle (A), SABO 200 (B), SABO 400 (C) e SABO 800 (D); onde SABO 200 = SABO 200mg/kg. SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg. Fotografia realizada em microscópio ótico Olympus® CX41® - aumento de 400X utilizando máquina fotográfica digital Nikon® L14®.

FÍGADO

Assim como no tecido cardíaco, não foram visualizadas alterações histológicas no tecido hepático. Tal fato pode ser verificado nas figuras 22 e 23.

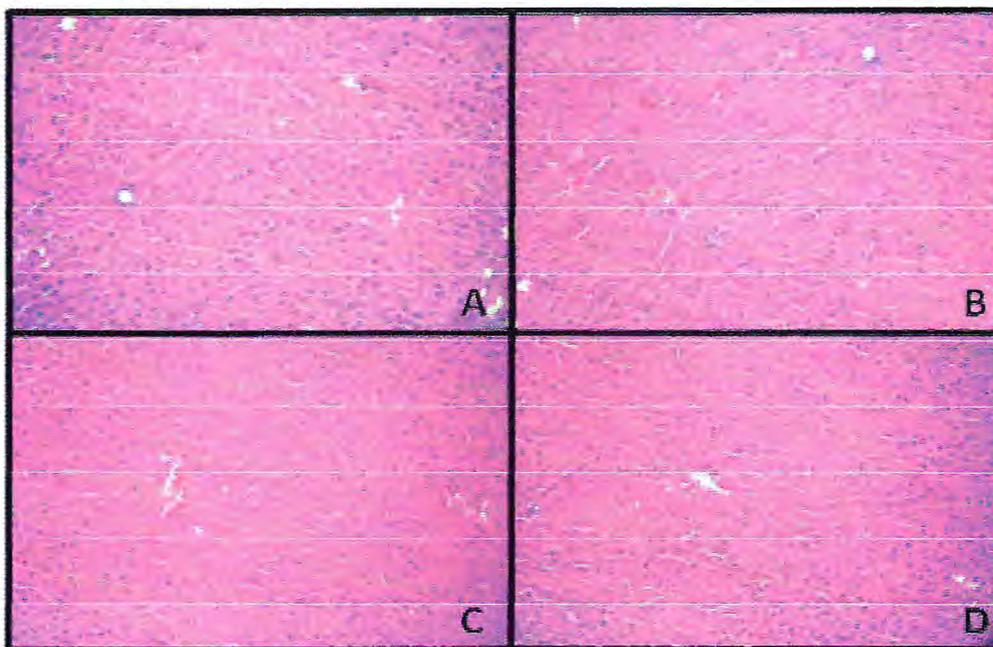


Figura 22. Microfotografia representativa no aumento de 200X do tecido hepático dos grupos controle (A), SABO 200 (B), SABO 400 (C) e SABO 800 (D); onde SABO 200 = SABO 200mg/kg. SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg. Fotografia realizada em microscópio ótico Olympus® CX41® - aumento de 200X utilizando máquina fotográfica digital Nikon® L14®.

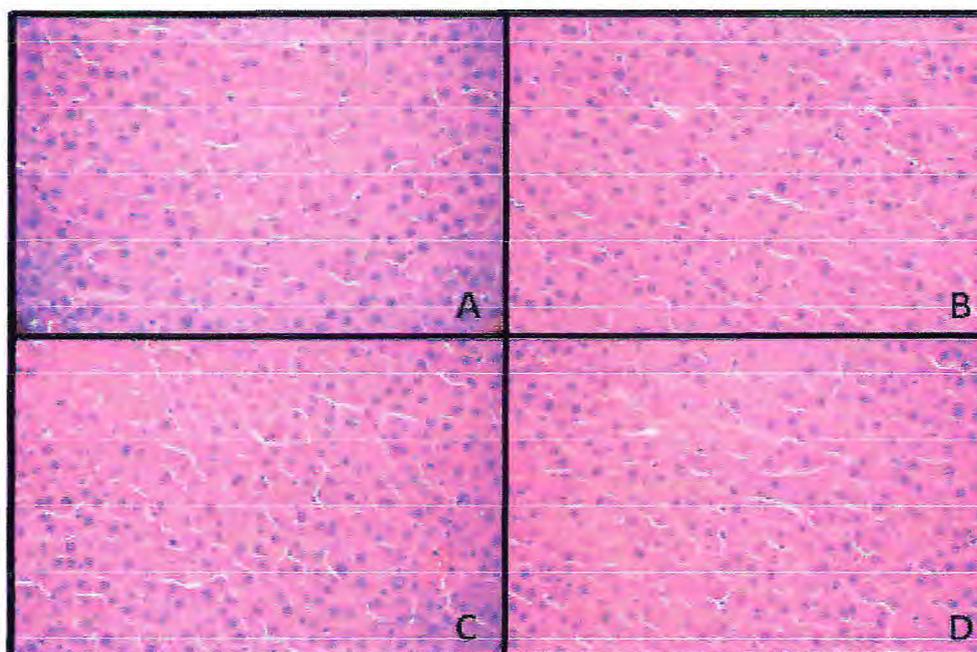


Figura 23. Microfotografia representativa no aumento de 400X do tecido hepático dos grupos controle (A), SABO 200 (B), SABO 400 (C) e SABO 800 (D); onde SABO 200 = SABO 200mg/kg. SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg. Fotografia realizada em microscópio ótico Olympus® CX41® - aumento de 400X utilizando máquina fotográfica digital Nikon® L14®.

RIM

Nas estruturas renais também não foram verificadas alterações histológicas como demonstrado na figuras 24 e 25.

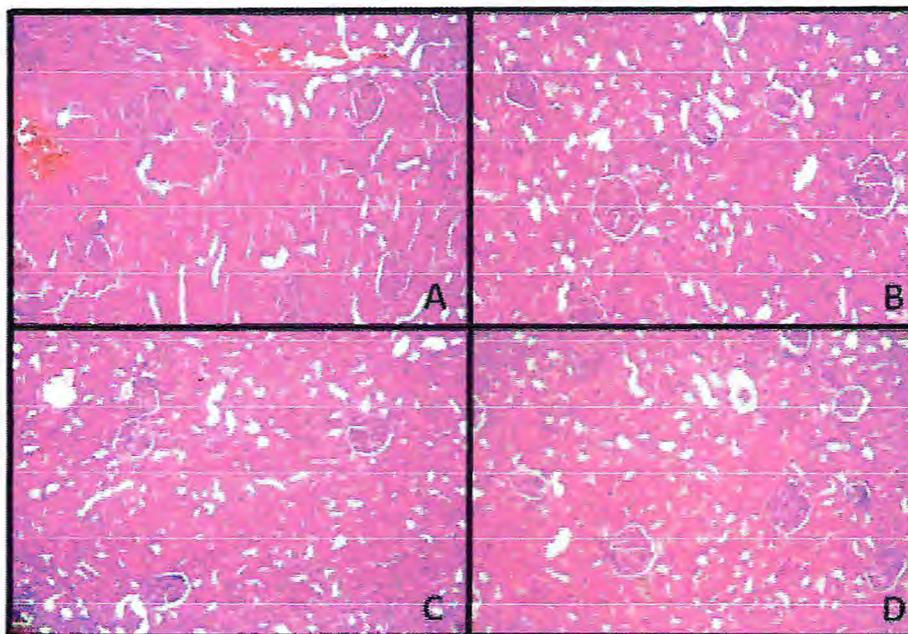


Figura 24. Microfotografia representativa no aumento de 200X do tecido renal dos grupos controle (A), SABO 200 (B), SABO 400 (C) e SABO 800 (D); onde SABO 200 = SABO 200mg/kg. SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg. Fotografia realizada em microscópio ótico Olympus® CX41® - aumento de 200X utilizando máquina fotográfica digital Nikon® L14®.

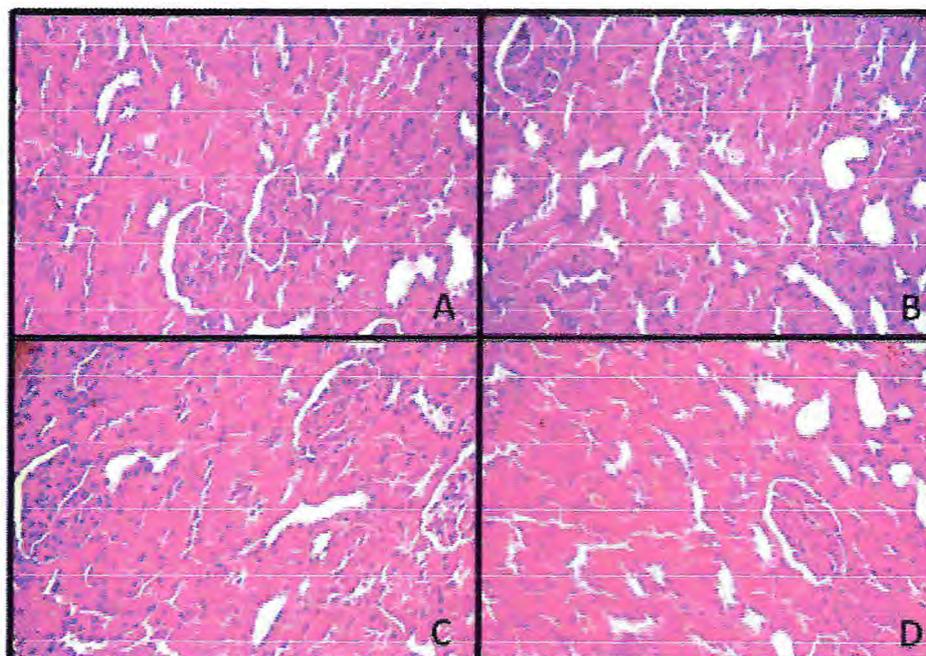


Figura 25. Microfotografia representativa no aumento de 400X do tecido renal dos grupos controle (A), SABO 200 (B), SABO 400 (C) e SABO 800 (D); onde SABO 200 = SABO 200mg/kg. SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg. Fotografia realizada em microscópio ótico Olympus® CX41® - aumento de 400X utilizando máquina fotográfica digital Nikon® L14®.

PULMÃO

As estruturas pulmonares também não demonstraram alterações após o protocolo de avaliação toxicológica das suspensões testadas como demonstrado nas figuras 26 e 27.

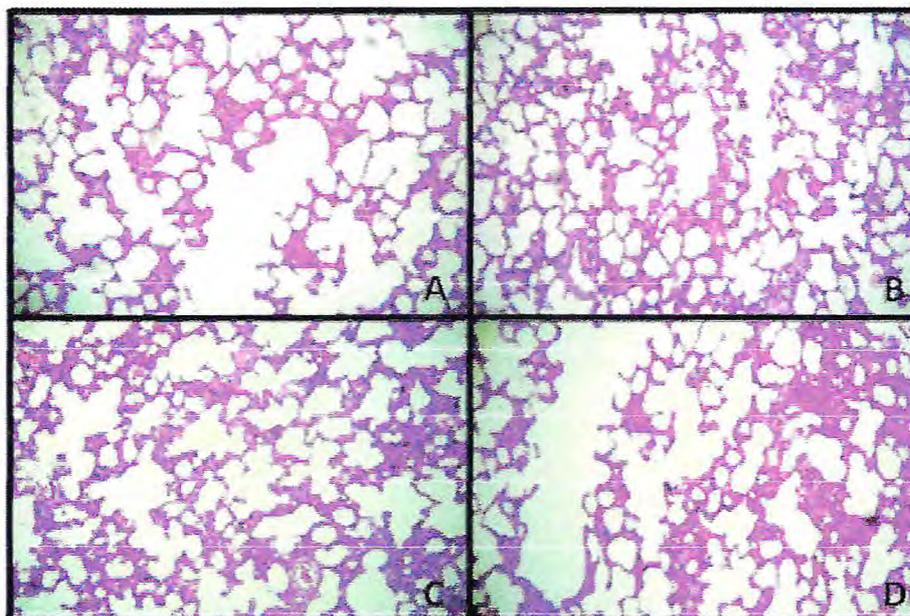


Figura 26. Microfotografia representativa no aumento de 200X do tecido pulmonar dos grupos controle (A), SABO 200 (B), SABO 400 (C) e SABO 800 (D); onde SABO 200 = SABO 200mg/kg. SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg. Fotografia realizada em microscópio ótico Olympus® CX41® - aumento de 200X utilizando máquina fotográfica digital Nikon® L14®.

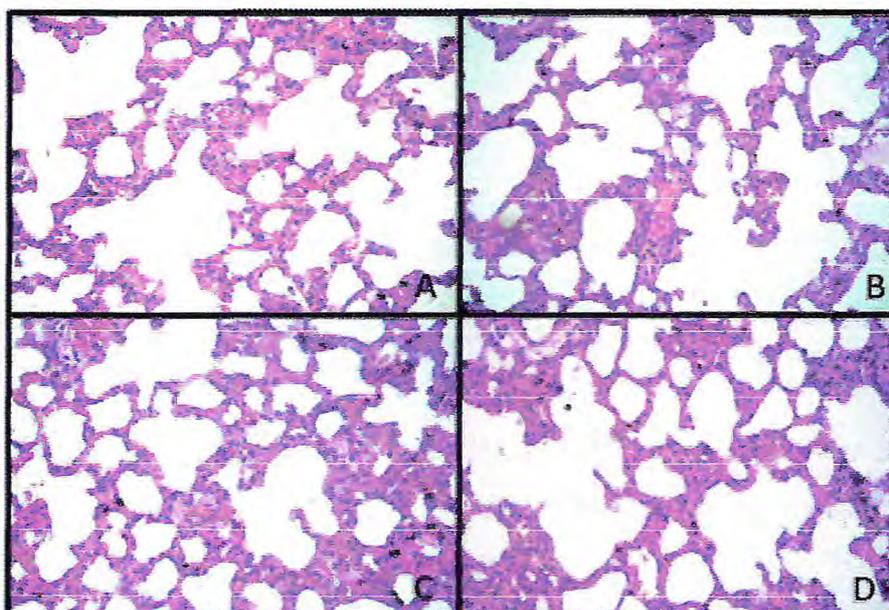


Figura 27. Microfotografia representativa no aumento de 400X do tecido pulmonar dos grupos controle (A), SABO 200 (B), SABO 400 (C) e SABO 800 (D); onde SABO 200 = SABO 200mg/kg. SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = 800mg/kg. Fotografia realizada em microscópio ótico Olympus® CX41® - aumento de 400X utilizando máquina fotográfica digital Nikon® L14®.

4.3 PROTOCOLO DE DISLIPIDEMIA INDUZIDA POR TRITON WR-1339

4.3.1 Efeito da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) sobre os níveis plasmáticos de triglicerídeos em camundongos tratados com Triton WR- 1339 (tyloxapol).

A injeção intraperitoneal de triton na dose de 400mg/kg induziu uma hiperlipidemia significativa nos camundongos, sendo mais relevante nas 24h após a sua administração. Nas 24h, observou-se um aumento dos TG ($4115,0 \pm 565,3$ mg/dL vs. $113,4 \pm 5,6$ mg/dL) havendo uma hipertrigliceridemia de 3528,7%, enquanto que nas 48h houve um aumento dos TG ($1394,0 \pm 270,5$ mg/dL vs. $124,2 \pm 8,1$ mg/dL), equivalente a uma elevação de 1022,4% (figura 28a e tabela 14).

Tabela 14. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) após 24h e 48h da hipertrigliceridemia induzida por triton. Os resultados dos experimentos (n=6) foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = SABO 800mg/kg, CT = colesterol total, TG = triglicerídeos, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo triton. (ANOVA e teste de Tukey).

Grupos experimentais	Parâmetros Bioquímicos	
	Triglicerídeos (mg/dL) – 24h	Triglicerídeos (mg/dL) – 48h
Controle	$113,4 \pm 5,6$	$124,2 \pm 8,1$
Triton WR-1339	$\uparrow 4115,0 \pm 565,3^a$	$\uparrow 1394,0 \pm 270,5^a$
Gemfibrozil + triton	$\downarrow 1982,0 \pm 309,6^b$	$\downarrow 421,3 \pm 176,4^b$
SABO 200 + triton	$3138,0 \pm 217,1$	$\downarrow 570,0 \pm 35,2^b$
SABO 400 + triton	$\downarrow 2160,0 \pm 294,7^b$	$\downarrow 686,7 \pm 128,5^b$
SABO 800 + triton	$\downarrow 1796,0 \pm 210,1^b$	$\downarrow 622,1 \pm 73,3^b$

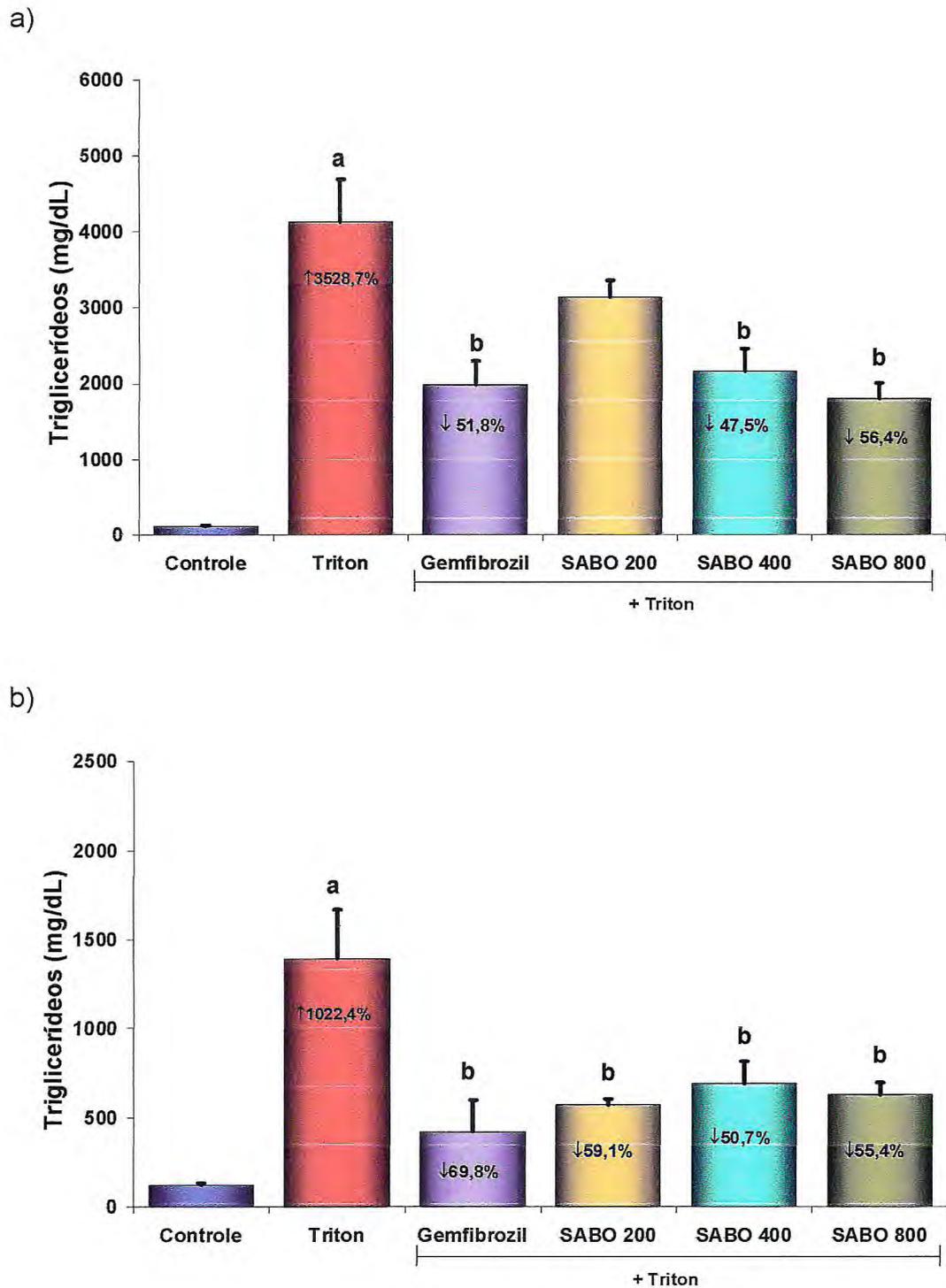


Figura 28. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) após 24h (a) e 48h (b) da hipertrigliceridemia induzida por triton. Os resultados dos grupos experimentais (n=6) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = SABO 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo triton (ANOVA e teste de Tukey).

A SABO 200mg/kg não promoveu redução significativa dos níveis de TG nas 24h após a injeção intraperitoneal de triton. Entretanto, no período de 48h, verificou-se uma diminuição significativa equivalente a 59,1% dos triglicerídeos do grupo tratado com a suspensão na dose de 200mg/kg ($570,0 \pm 35,2\text{mg/dL}$) quando comparado ao grupo triton ($1394,0 \pm 270,5\text{mg/dL}$) (figura 28b e tabela 14).

A administração de SABO 400mg/kg, por via oral, reduziu significativamente o aumento induzido por triton nos níveis plasmáticos de triglicerídeos em 47,5% e 50,7% nas 24h (figura 28a) e 48h (figura 28b), respectivamente, enquanto que a SABO na dose de 800mg/kg, promoveu uma redução em 56,4% nas 24h (figura 28a) e de 55,4% nas 48h (figura 28b).

Em relação ao Gemfibrozil 100mg/kg, obteve-se uma diminuição relevante dos triglicerídeos de 51,8% nas 24h e de 69,8% nas 48h de experimento, de acordo como demonstrado na tabela 14, figuras 28a e 28b.

4.3.2 Efeito da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) sobre os níveis plasmáticos de colesterol total em camundongos tratados com Triton WR 1339 (tyloxapol).

De acordo com as figuras 29a e 29b, o triton 400mg/kg também induziu um aumento na concentração plasmática de CT ($572,5 \pm 28,4\text{mg/dL}$) nas 24h, quando comparado com o grupo controle ($110,0 \pm 4,8\text{mg/dL}$), o equivalente a uma hipercolesterolemia de 420,5%, enquanto que nas 48h houve uma elevação do CT de 195,3% ($336,3 \pm 42,0\text{mg/dL}$) quando comparado com o grupo controle ($113,9 \pm 3,3\text{mg/dL}$).

Tabela 15. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) após 24h e 48h da hipercolesterolemia induzida por triton. Os resultados dos experimentos (n=6) foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = SABO 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo triton. (ANOVA e teste de Tukey).

Grupos experimentais	Parâmetros Bioquímicos	
	Colesterol total (mg/dL) – 24h	Colesterol total (mg/dL) – 48h
Controle	110,0 \pm 4,8	113,9 \pm 3,3
Triton WR-1339	\uparrow 572,5 \pm 28,4 ^a	\uparrow 336,3 \pm 42,0 ^a
Gemfibrozil + triton	\downarrow 433,0 \pm 13,4 ^b	\downarrow 166,2 \pm 15,1 ^b
SABO 200 + triton	507,3 \pm 31,6	248,8 \pm 24,4
SABO 400 + triton	534,0 \pm 29,3	281,6 \pm 19,5
SABO 800 + triton	511,3 \pm 42,4	393,1 \pm 39,5

O gemfibrozil na dose de 100mg/kg proporcionou uma redução dos níveis de colesterol total nas 24h (figura 29a) em 24,4% (572,5 \pm 28,4mg/dL vs. 433,0 \pm 13,4mg/dL) e de 50,6%, nas 48h (figura 29b) (336,3 \pm 42,0mg/dL vs. 166,2 \pm 15,1mg/dL) quando comparado com o grupo triton (tabela 15).

Entretanto, a suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana*, em nenhuma das concentrações estudadas, foi capaz de reverter a hipercolesterolemia induzida pelo triton (tabela 15).

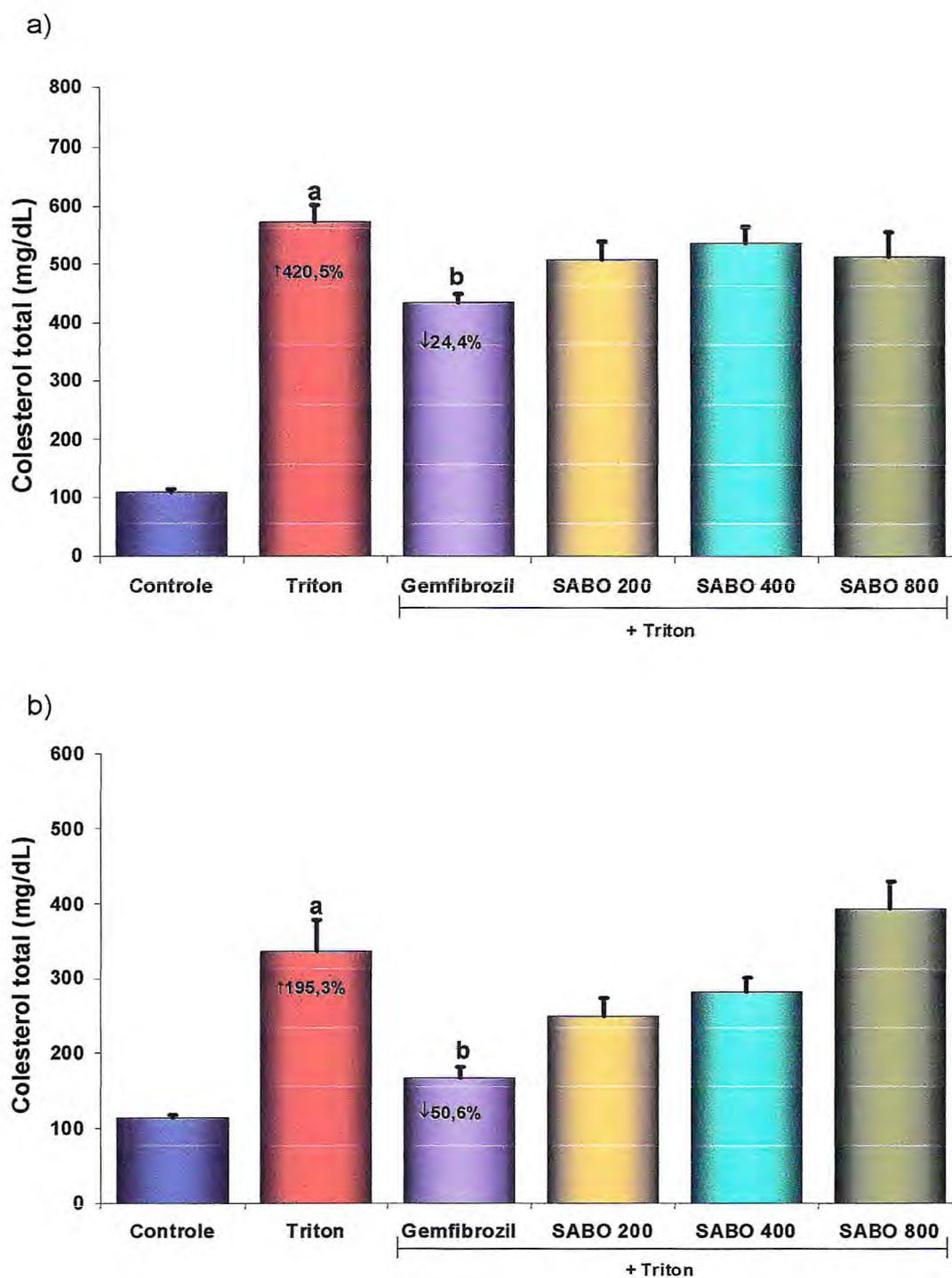


Figura 29. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) após 24 h (a) e 48h (b) da hipercolesterolemia induzida por triton. Os resultados dos grupos experimentais (n=6) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = SABO 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo triton (ANOVA e teste de Tukey).

4.4 PROTOCOLO DE DISLIPIDEMIA INDUZIDA POR ETANOL

4.4.1 Efeito da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) sobre os níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol total em camundongos tratados com etanol.

A administração de etanol (10% e 26%) nos animais foi capaz de elevar os níveis plasmáticos de triglicerídeos. A variação dos TG foi de $92,7 \pm 4,08$ mg/dL para $216,0 \pm 20,11$ mg/dL nos animais do grupo etanol, correspondendo a uma hipertrigliceridemia de 133,0% (figura 30 e tabela 16).

De acordo com a tabela 16, verifica-se que a SABO 200mg/kg não foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de triglicerídeos.

Entretanto, o tratamento dos animais com SABO 400mg/kg, por via oral, foi capaz de reduzir significativamente o aumento dos níveis plasmáticos de TG induzido por etanol em 33,6% ($216,0 \pm 20,11$ mg/dL vs. $143,5 \pm 25,00$ mg/dL), enquanto que a administração de SABO na dose 800mg/kg promoveu uma redução em 62,2% ($216,0 \pm 20,11$ mg/dL vs. $81,7 \pm 9,79$ mg/dL) (figura 30).

Os níveis plasmáticos de colesterol total não se alteraram em nenhum dos grupos estudados durante todo o experimento, como demonstrado na tabela 16.

Tabela 16. Níveis plasmáticos de colesterol total e triglicerídeos dos grupos controle, etanol, SABO 200, SABO 400 e SABO 800, após hipertrigliceridemia induzida por etanol 10 e 26%. Os resultados dos grupos experimentais (n=6) foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = SABO 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo etanol, c = $p < 0,05$ em relação ao grupo SABO 200. (ANOVA e teste de Tukey)

Grupos experimentais	Parâmetros Bioquímicos	
	Triglicerídeos (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)
Controle	92,7 \pm 4,08	102,2 \pm 2,65
Etanol	\uparrow 216,0 \pm 20,11 ^a	114,7 \pm 5,95
SABO 200 + etanol	157,8 \pm 16,40	108,7 \pm 7,29
SABO 400 + etanol	\downarrow 143,5 \pm 25,00 ^b	107,8 \pm 4,54
SABO 800 + etanol	\downarrow 81,7 \pm 9,79 ^{b,c}	122,3 \pm 6,65

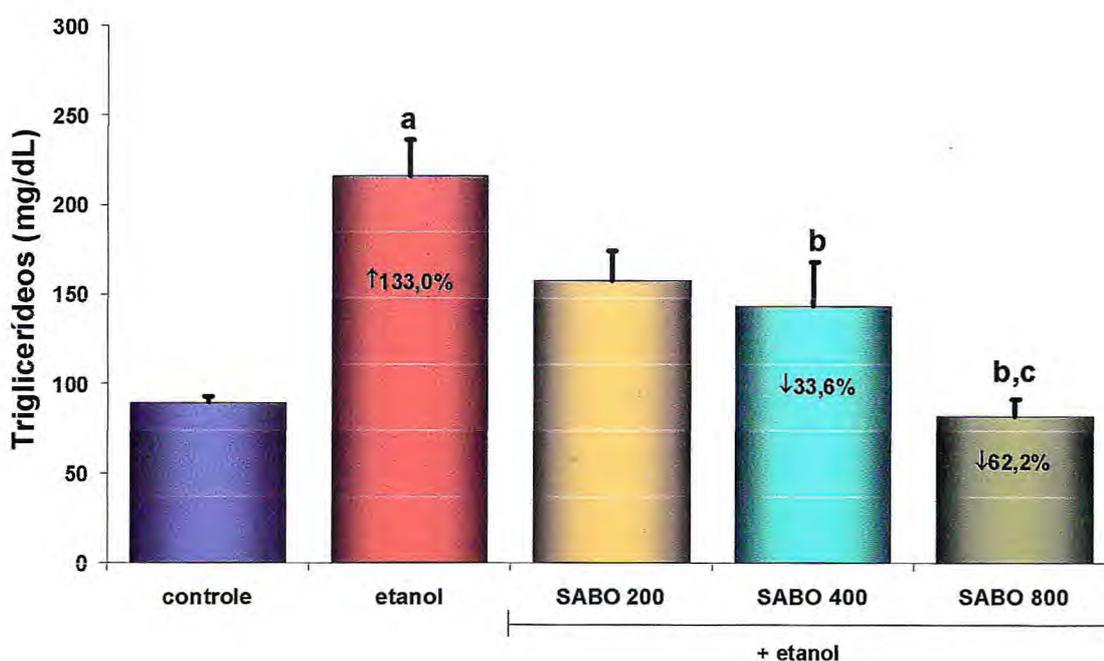


Figura 30. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) na hipertrigliceridemia induzida por etanol 10% e 26%. Os resultados dos grupos experimentais (n=6) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = SABO 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo etanol, c = $p < 0,05$ em relação ao grupo SABO 200 (ANOVA e teste de Tukey).

4.5 PROTOCOLO DE DISLIPIDEMIA INDUZIDA POR POLOXAMER-407

4.5.1 Efeito da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) sobre os níveis plasmáticos de glicose em camundongos tratados com poloxamer (P-407).

A administração única de poloxamer-407 na dose de 1000mg/kg, por via intraperitoneal, além de induzir a hiperlipidemia proporcionou um aumento de 121,3% ($440,3 \pm 33,09\text{mg/dL}$ vs. $199,0 \pm 2,54\text{mg/dL}$) dos níveis plasmáticos de glicose somente nas 24h (figura 31a). Após 48h (figura 31b) e 72h (figura 31c) de experimentação, esse parâmetro retornou aos níveis normais, ressaltando-se que, nas 48h, não foi visualizada significância estatística entre os grupos controle ($205,5 \pm 3,23\text{mg/dL}$) e P-407 ($221,7 \pm 5,87\text{mg/dL}$) (tabela 17).

No período de 24h, o tratamento com a SABO 200mg/kg ($440,3 \pm 33,09\text{mg/dL}$ vs. $351,3 \pm 22,14\text{mg/dL}$), SABO 400mg/kg ($440,3 \pm 33,09\text{mg/dL}$ vs. $267,2 \pm 21,55\text{mg/dL}$) e SABO 800mg/kg ($440,3 \pm 33,09\text{mg/dL}$ vs. $331,8 \pm 35,47\text{mg/dL}$) reduziu os níveis glicêmicos na ordem de 20,2% (SABO 200), 39,3% (SABO 400) e 24,6% (SABO 800) (tabela 17 e figura 31a).

Em relação ao período de 48h (figura 31b), a SABO 200 ($192,3 \pm 7,85\text{mg/dL}$), 400 ($188,5 \pm 6,55\text{mg/dL}$) e 800 ($186,7 \pm 3,21\text{mg/dL}$) bem como o gemfibrozil 100mg/kg ($187,2 \pm 7,86\text{mg/dL}$) demonstraram uma diminuição da glicemia, apesar dos animais do grupo P-407 ($221,7 \pm 5,87\text{mg/dL}$) não apresentarem um quadro de hiperglicemia nesse tempo.

Nas 72h (figura 31c e tabela 17), não foram visualizadas diferenças estatisticamente significantes entre os valores de glicose dos grupos controle, SABO 200mg/kg, SABO 400mg/kg, SABO 800mg/kg e gemfibrozil 100mg/kg.

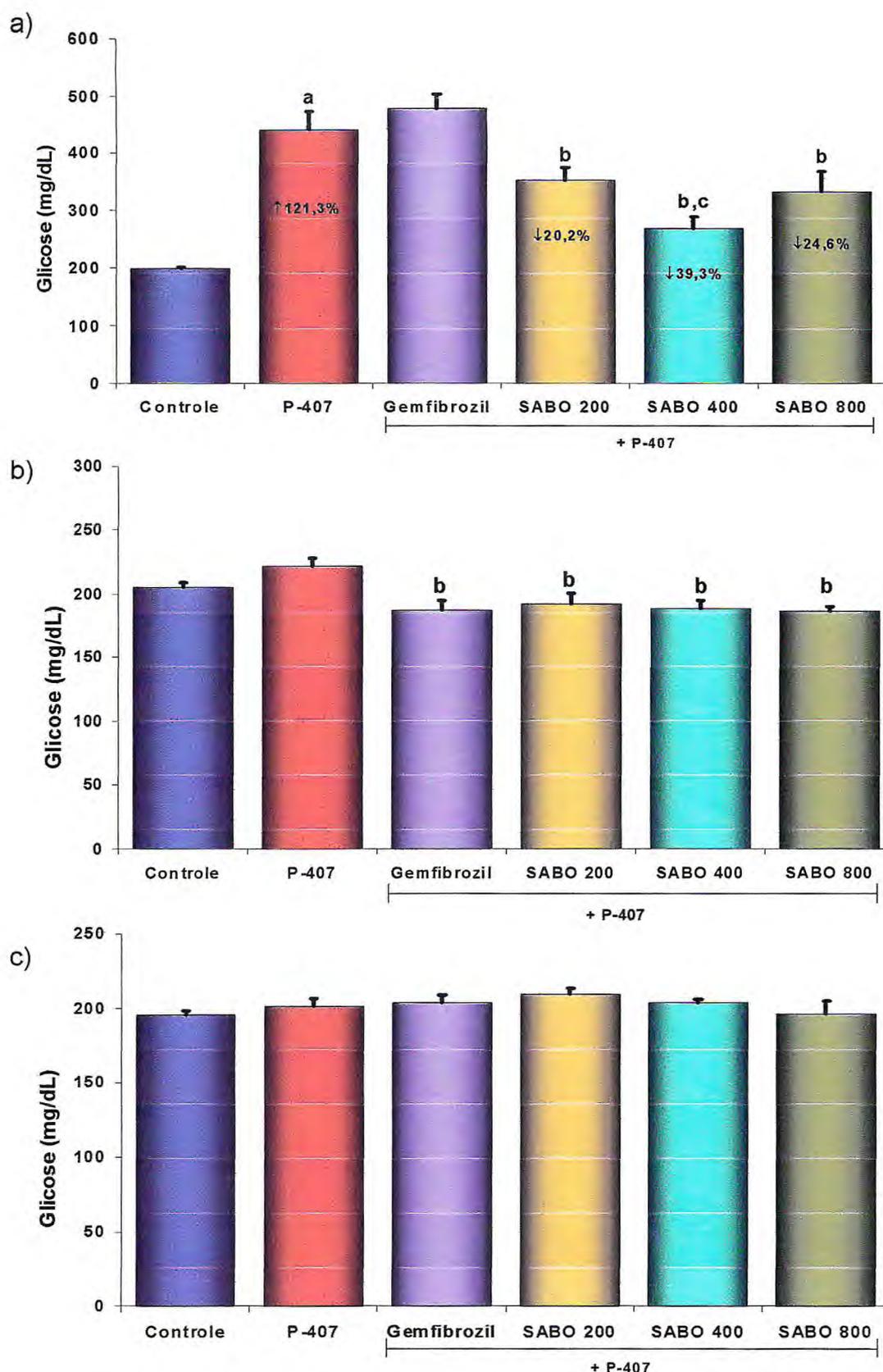


Figura 31. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) na glicemia, após 24h (a), 48h (b) e 72h (c) da administração intraperitoneal de poloxamer. Os resultados (n=6) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde P-407 = poloxamer-407 1000mg/kg; SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = SABO 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo P-407, c = $p < 0,05$ em relação ao grupo gemfibrozil (ANOVA e teste de Tukey).

Tabela 17. Níveis plasmáticos de glicose dos grupos controle, P-407, Gemfibrozil, SABO 200, SABO 400 e SABO 800, após administração intraperitoneal de poloxamer-407. Os resultados dos grupos experimentais (n=6) foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde P-407 = poloxamer-407 1000mg/kg, SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 =SABO 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo P-407 (ANOVA – teste de Tukey).

Grupos experimentais	Parâmetros Bioquímicos		
	Glicose (mg/dL) - 24h	Glicose (mg/dL) - 48h	Glicose (mg/dL) - 72h
Controle	199,0 \pm 2,54	205,5 \pm 3,23	195,5 \pm 2,83
P- 407	\uparrow 440,3 \pm 33,09 ^a	221,7 \pm 5,87	201,3 \pm 5,32
Gemfibrozil + P-407	478,0 \pm 24,52	\downarrow 187,2 \pm 7,86 ^b	203,8 \pm 5,05
SABO 200 + P-407	\downarrow 351,3 \pm 22,14 ^b	\downarrow 192,3 \pm 7,85 ^b	209,5 \pm 4,32
SABO 400 + P-407	\downarrow 267,2 \pm 21,55 ^{b,c}	\downarrow 188,5 \pm 6,55 ^b	203,8 \pm 2,60
SABO 800 + P-407	\downarrow 331,8 \pm 35,47 ^b	\downarrow 186,7 \pm 3,21 ^b	196,5 \pm 8,47

4.5.2 Efeito da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) sobre os níveis plasmáticos de triglicerídeos em camundongos tratados com poloxamer (P-407).

A figura 32 e tabela 18 demonstram que a injeção intraperitoneal de poloxamer-407 1000mg/kg induziu uma hipertrigliceridemia significativa nos camundongos, nas 24h, 48h e 72h após a sua administração, sendo mais relevante no primeiro dia do protocolo.

Durante o experimento, nas 24h (figura 32a), observou-se uma hipertrigliceridemia de 7087,7% (7928,0 \pm 596,8mg/dL) quando comparado com o grupo controle (110,3 \pm 4,4 mg/dL). Ainda no mesmo tempo, verificou-se que somente a SABO na dose de 400mg/kg (7928,0 \pm 596,8mg/dL vs. 6440,0 \pm 177,6 mg/dL) reduziu os níveis desse parâmetro em 18,8%.

Em relação ao período de 48h (figura 32b e tabela 18), ocorreu um aumento dos TG ($4825,0 \pm 341,8\text{mg/dL}$) quando comparado com o grupo controle ($149,0 \pm 8,7\text{mg/dL}$), equivalente a uma elevação de 3138,3%. A figura 32b demonstra ainda que nas 48h o tratamento com a suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* proporcionou uma redução significativa dos TG equivalente a 36,9% para SABO 400mg/kg ($3045,0 \pm 116,5\text{mg/dL}$) e 28,8% para SABO 800mg/kg ($3530,0 \pm 343,4\text{mg/dL}$) quando comparado com o grupo P-407 ($4825,0 \pm 341,8\text{mg/dL}$).

Nas 72h a hipertrigliceridemia visualizada foi de 959,6% ($2593,0 \pm 206,0$ vs. $244,7 \pm 14,9\text{mg/dL}$). Todas as doses de SABO, nesse tempo, promoveram redução dos níveis de TG que em percentual foi de 38,6% (SABO 200), 68,2% (SABO 400) e 58% (SABO 800). Além disso, o grupo tratado com gemfibrozil diminuiu em 33,4% os níveis desse parâmetro. É interessante ressaltar que a SABO 200 e o gemfibrozil, até então, não tinham demonstrado nenhuma redução significativa (figura 32c).

Tabela 18. Níveis plasmáticos de triglicerídeos dos grupos, controle, P-407, Gemfibrozil, SABO 200, SABO 400 e SABO 800, após administração intraperitoneal de poloxamer-407. Os resultados dos grupos experimentais (n=6) foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM), onde P-407 = poloxamer-407 1000mg/kg, SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = SABO 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo P-407, c = $p < 0,05$ em relação ao grupo gemfibrozil, d = $p < 0,05$ em relação ao grupo SABO 200. (ANOVA e teste de Tukey).

Grupos Experimentais	Parâmetros Bioquímicos		
	Triglicerídeos (mg/dL) - 24h	Triglicerídeos (mg/dL) - 48h	Triglicerídeos (mg/dL) - 72h
Controle	$110,3 \pm 4,4$	$149,0 \pm 8,7$	$244,7 \pm 14,9$
P- 407	$\uparrow 7928,0 \pm 596,8^a$	$\uparrow 4825,0 \pm 341,8^a$	$\uparrow 2593,0 \pm 206,0^a$
Gemfibrozil + P-407	$7615,0 \pm 234,8$	$4418,0 \pm 411,8$	$\downarrow 1727 \pm 230,7^b$
SABO 200 + P-407	$7465,0 \pm 245,6$	$4335,0 \pm 185,4$	$\downarrow 1593,0 \pm 59,3^b$
SABO 400 + P-407	$\downarrow 6440,0 \pm 177,6^b$	$\downarrow 3045,0 \pm 116,5^{b,c,d}$	$\downarrow 825,7 \pm 27,4^{b,c,d}$
SABO 800+ P-407	$6673 \pm 441,4$	$\downarrow 3530,0 \pm 343,4^b$	$\downarrow 1090,0 \pm 165,0^b$

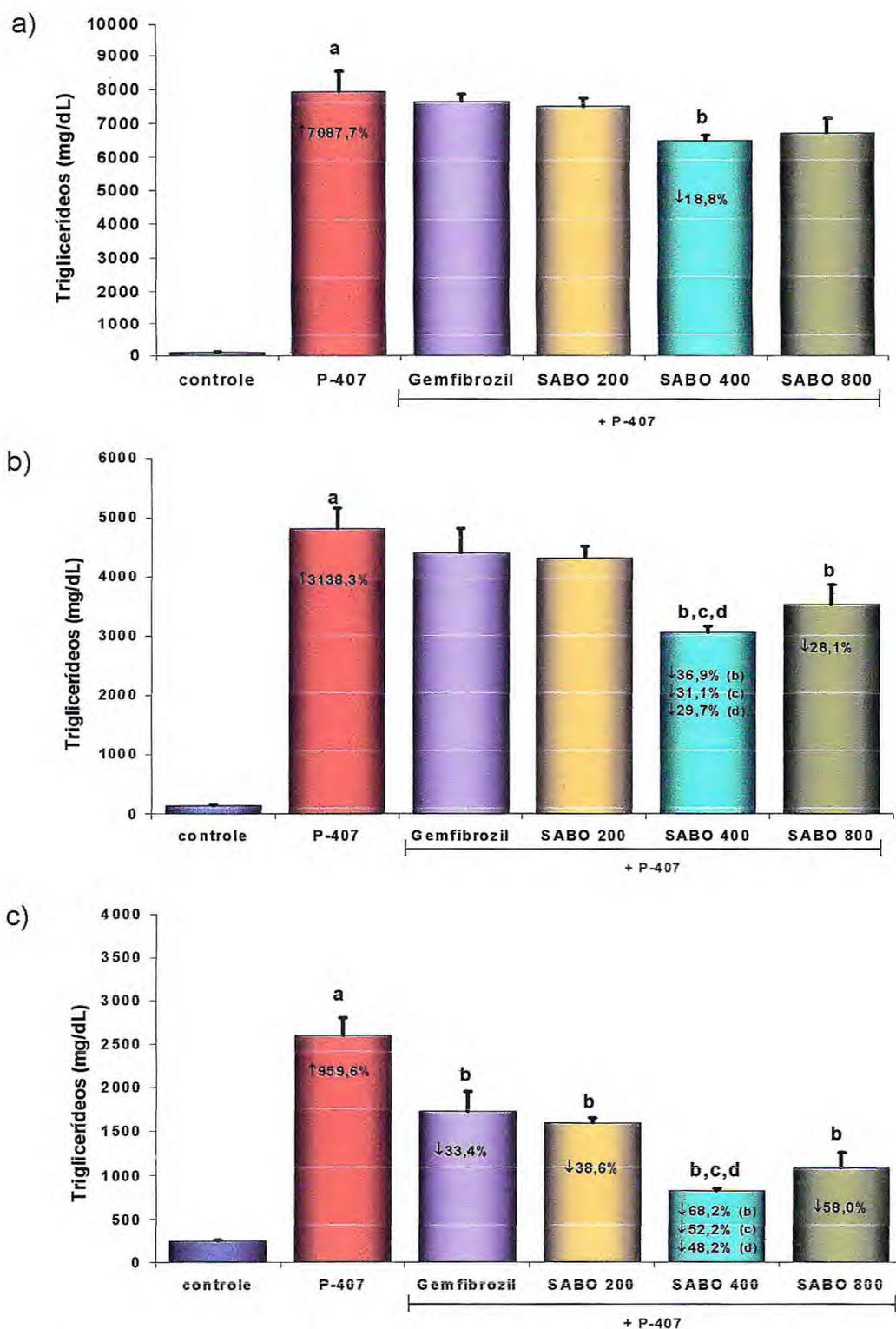


Figura 32. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) na hipertriglicericemia, após 24 (a), 48 (b) e 72h (c) da administração intraperitoneal de poloxamer. Os resultados (n=6) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde P-407 = poloxamer-407 1000mg/kg; SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = SABO 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao controle, b = $p < 0,05$ em relação ao triton, c = $p < 0,05$ em relação ao grupo gemfibrozil, d = $p < 0,05$ em relação ao SABO 200 (ANOVA e teste de Tukey).

4.5.3 Efeito da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) sobre os níveis plasmáticos de colesterol total em camundongos tratados com poloxamer (P-407).

Comparando-se as médias do grupo P-407 com o controle (tabela 19) observou-se um aumento de 495,4% ($708,5 \pm 28,37\text{mg/dL}$ vs. $119,0 \pm 2,38 \text{ mg/dL}$), 411,2% ($640,0 \pm 32,22\text{mg/dL}$ vs. $125,2 \pm 1,25\text{mg/dL}$) e 245,8% ($442,0 \pm 36,30\text{mg/dL}$ vs. $127,8 \pm 3,35\text{mg/dL}$) para os tempos de 24 (figura 33a), 48 (figura 33b) e 72h (figura 33c), nessa ordem.

O gemfibrozil 100mg/kg ($340,8 \pm 20,36\text{mg/dL}$), por sua vez, diminuiu em 22,9% a concentração plasmática desse parâmetro bioquímico, somente nas 72h (figura 33c), quando comparado com o grupo P-407 ($442, \pm 36,30\text{mg/dL}$). A suspensão das sementes de *Bixa orellana* nas doses estudadas não foi eficaz na redução dos níveis de colesterol total em nenhum dos tempos (tabela 19).

Tabela 19. Níveis plasmáticos de colesterol total dos grupos, controle, P-407, Gemfibrozil, SABO 200, SABO 400 e SABO 800, após administração intraperitoneal de poloxamer-407. Os resultados dos grupos experimentais (n=6) foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) onde P-407 = poloxamer-407 1000mg/kg , SABO 200 = SABO 200mg/kg , SABO 400 = SABO 400mg/kg , SABO 800 =SABO 800mg/kg , a = $p<0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p<0,05$ em relação ao grupo P-407. (ANOVA e teste de Tukey).

Grupos experimentais	Parâmetros bioquímicos		
	Colesterol total (mg/dL) - 24h	Colesterol total (mg/dL) - 48h	Colesterol total (mg/dL) - 72h
Controle	$119,0 \pm 2,38$	$125,2 \pm 1,25$	$127,8 \pm 3,35$
P- 407	$\uparrow 708,5 \pm 28,37^a$	$\uparrow 640,0 \pm 32,22^a$	$\uparrow 442,0 \pm 36,30^a$
Gemfibrozil + P-407	$748,0 \pm 18,17$	$619,3 \pm 14,74$	$\downarrow 340,8 \pm 20,36^b$
SABO 200 + P-407	$749,8 \pm 23,68$	$652,8 \pm 12,45$	$399,2 \pm 15,69$
SABO 400 + P-407	$736,3 \pm 18,58$	$594,2 \pm 14,58$	$355,3 \pm 13,61$
SABO 800 + P-407	$761,0 \pm 24,80$	$671,0 \pm 31,45$	$360,5 \pm 32,49$

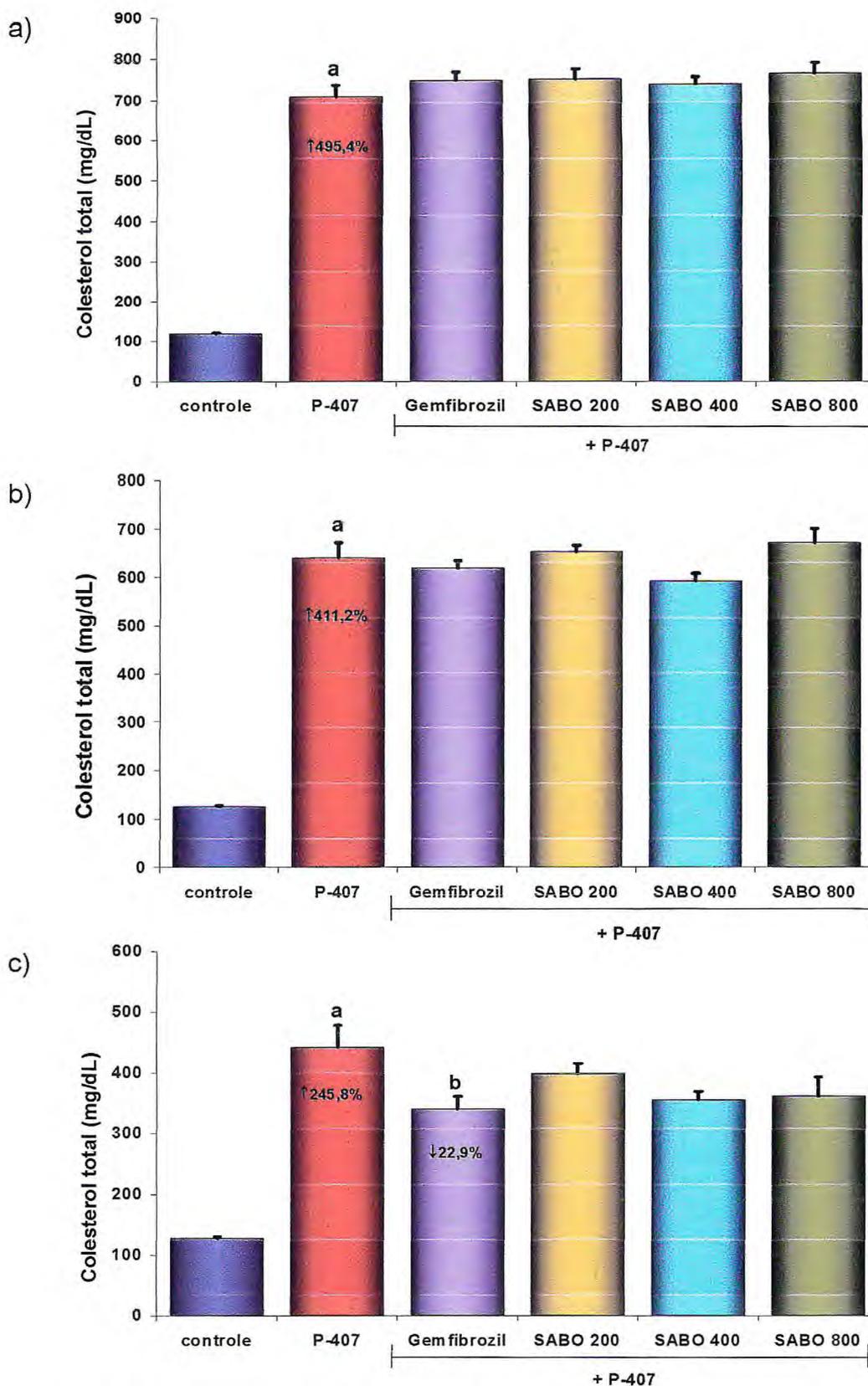


Figura 33. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) na hipercolesterolemia, após 24 (a), 48 (b) e 72h (c) da administração intraperitoneal de poloxamer. Os resultados dos grupos experimentais (n=6) foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM), onde P-407 = poloxamer-407 1000mg/kg; SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = SABO 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo P-407 (ANOVA e teste de Tukey).

4.5.4 Efeito da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) sobre os níveis plasmáticos de amilase e lipase em camundongos tratados com poloxamer (P-407).

As enzimas relacionadas com o metabolismo dos carboidratos e lipídios, amilase e lipase, respectivamente, foram alteradas após a administração intraperitoneal de poloxamer-407.

Em relação à concentração sérica de amilase, verifica-se que essa foi reduzida nas 24h ($725,5 \pm 37,1\text{mg/dL}$ vs. $1114,0 \pm 49,5\text{mg/dL}$) e 48h ($886,3 \pm 33,8\text{mg/dL}$ vs. $1118,0 \pm 21,3\text{mg/dL}$) após indução com poloxamer-407 1000mg/kg, quando comparado com o grupo controle, retornando aos níveis normais nas 72h (tabela 20). Nem o gemfibrozil 100mg/kg e a SABO nas doses estudadas conseguiram reverter a redução da amilase promovida por poloxamer-407.

Tabela 20. Níveis plasmáticos amilase dos grupos controle, P-407, Gemfibrozil, SABO 200, SABO 400 e SABO 800, após administração intraperitoneal de poloxamer-407. Os resultados dos experimentos (n=6) foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.) onde P-407 = poloxamer-407 1000mg/kg, SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 =SABO 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. (ANOVA e teste de Tukey).

Grupos Experimentais	Parâmetros Bioquímicos		
	Amilase (U/L) - 24h	Amilase (U/L) - 48h	Amilase (U/L) - 72h
Controle	$1114,0 \pm 49,5$	$1118,0 \pm 21,3$	$1137,0 \pm 46,3$
P-407	$\downarrow 725,5 \pm 37,1^a$	$\downarrow 886,3 \pm 33,8^a$	$1025,0 \pm 27,2$
Gemfibrozil + P-407	$751,5 \pm 23,1$	$987,8 \pm 38,0$	$1024,0 \pm 29,6$
SABO 200 + P-407	$720,0 \pm 33,6$	$865,5 \pm 43,8$	$1069,0 \pm 47,5$
SABO 400 + P-407	$724,3 \pm 26,1$	$971,3 \pm 32,6$	$1070,0 \pm 14,2$
SABO 800 + P-407	$624,3 \pm 31,0$	$817,7 \pm 47,5$	$1001,0 \pm 40,3$

Os níveis plasmáticos de lipase, por sua vez, permaneceram aumentados durante todo o período de experimentação. Assim, verificou-se que nem o gemfibrozil 100mg/kg, nem a SABO, nas doses estudadas foram capazes de reverter essa alteração desencadeada pela administração intraperitoneal de poloxamer-407 (tabela 21).

Tabela 21. Níveis plasmáticos lipase dos grupos controle, P-407, Gemfibrozil, SABO 200, SABO 400 e SABO 800, após administração intraperitoneal de poloxamer-407. Os resultados dos grupos experimentais (n=6) foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde P-407 = poloxamer-407 1000mg/kg, SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = SABO 800mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA e teste de Tukey).

Grupos Experimentais	Parâmetros Bioquímicos		
	Lipase (U/L) - 24h	Lipase (U/L) - 48h	Lipase (U/L) - 72h
Controle	265,0 \pm 2,9	269,3 \pm 9,1	265,6 \pm 5,4
P-407	286,5 \pm 4,6	\uparrow 308,4 \pm 1,60 ^a	\uparrow 296,9 \pm 2,0 ^a
Gemfibrozil + P-407	276,7 \pm 5,7	295,1 \pm 3,7	283,7 \pm 7,2
SABO 200 + P-407	277,0 \pm 7,6	314,2 \pm 2,4	301,0 \pm 1,2
SABO 400 + P-407	283,1 \pm 9,3	292,3 \pm 2,9	282,9 \pm 4,9
SABO 800 + P-407	284,1 \pm 5,1	305,3 \pm 1,6	302,4 \pm 4,2

4.5.5 Efeito das partições n-butanólica (N-BUT), acetato (AC), clorofórmica (CLO) e hexânica (HX) obtidas a partir da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) sob os níveis plasmáticos de glicose em camundongos tratados com poloxamer (P-407).

A administração intraperitoneal de poloxamer-407 1000mg/kg elevou os níveis de glicose em 104,2% (406,3 \pm 11,9mg/dL vs. 199,0 \pm 2,5mg/dL), somente nas 24h, comparando-se com os grupos P-407 e controle (figura 34a e tabela 22).

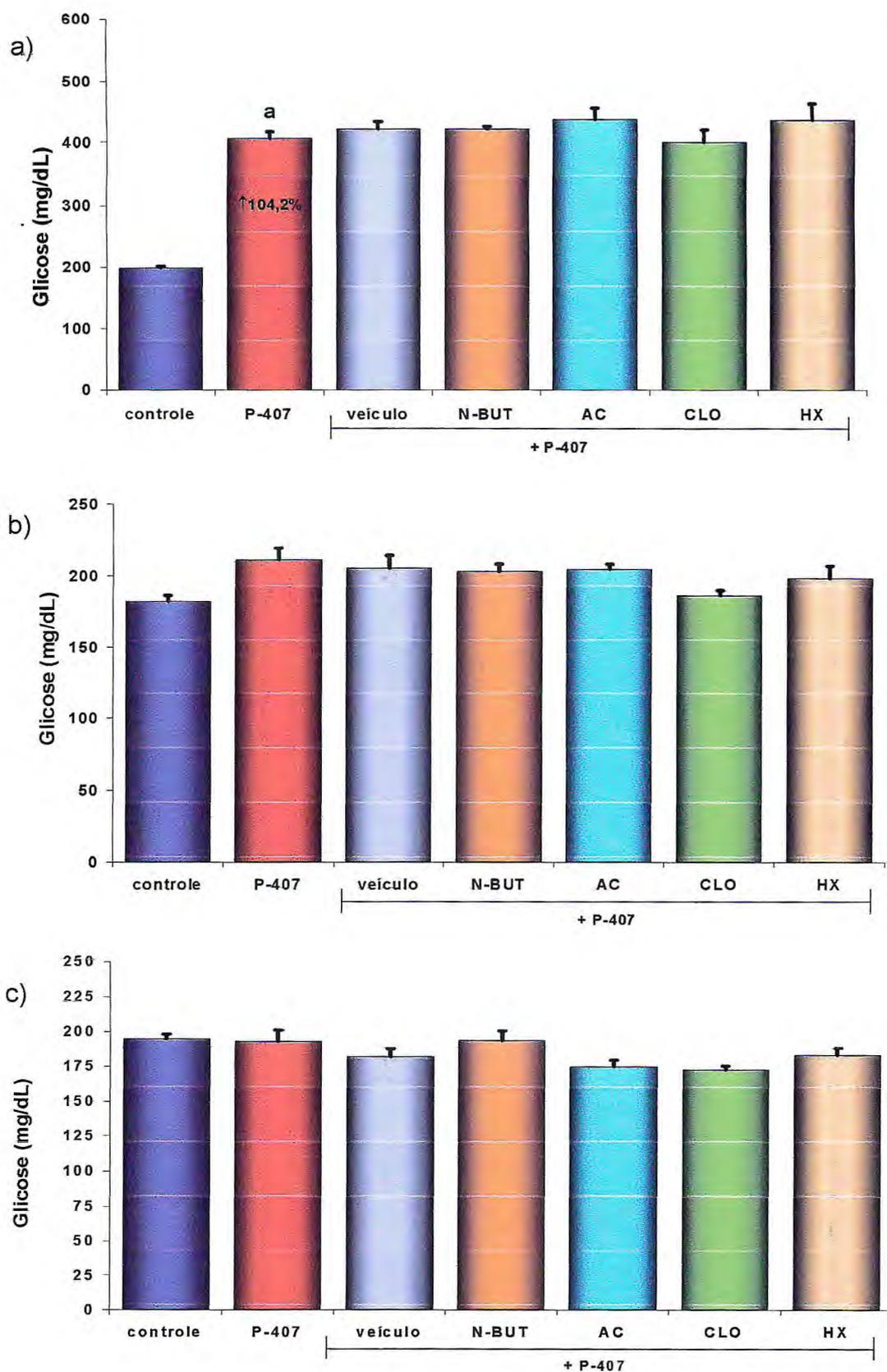


Figura 34. Efeito da administração das partições obtidas da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) na hiperglicemia após 24(a), 48(b) e 72h(c) da administração intraperitoneal de poloxamer. Os resultados dos grupos experimentais (n=6) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde P-407 = poloxamer-407 1000mg/kg; N-BUT = partição n-butanólica, AC = partição acetato, CLO = partição clorofórmica, HX = partição hexânica, a = p < 0,05 em relação ao grupo controle (ANOVA e teste de Tukey).

Ainda de acordo com a figura 34a e tabela 22, no período de 24h, verificou-se que nenhuma das partições testadas, tanto a n-butanólica, acetato, clorofórmica e hexânica, demonstrou efeito redutor no quadro de hiperglicemia induzida pelo tratamento com poloxamer-407

Entretanto, no período de 48h (figura 34b) ($211,3 \pm 8,0\text{mg/dL}$ vs. $182,3 \pm 4,2\text{mg/dL}$) e 72h (figura 34c) ($192,7 \pm 8,2\text{mg/dL}$ vs. $194,5 \pm 3,8\text{mg/dL}$), a concentração plasmática de glicose retornou aos níveis normais (tabela 22), não se verificando, nos tempos citados, significância estatística entre os grupos P-407 e controle.

Tabela 22. Níveis plasmáticos de glicose dos grupos tratados com salina (grupos controle e P-407), veículo ou partições (n-butanol, acetato, clorofórmio, hexano) após administração intraperitoneal de poloxamer-407. Os resultados dos experimentos (n=6) foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde P-407 = poloxamer-407 1000mg/kg, VC = veículo, N-BUT = partição n-butanólica, AC = partição acetato de etila, CLO = partição clorofórmica, HX = partição hexânica, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. (ANOVA e teste de Tukey).

Grupos experimentais	Parâmetros Bioquímicos		
	Glicemia (mg/dL) - 24h	Glicemia (mg/dL) - 48h	Glicemia (mg/dL) - 72h
Controle	$199,0 \pm 2,5$	$182,3 \pm 4,2$	$194,5 \pm 3,8$
P-407	$\uparrow 406,3 \pm 11,9^a$	$211,3 \pm 8,0$	$192,7 \pm 8,2$
VC + P-407	$422,0 \pm 12,7$	$205,2 \pm 8,9$	$181,7 \pm 5,7$
N-BUT + P-407	$421,3 \pm 5,2$	$203,0 \pm 5,4$	$193,5 \pm 6,9$
AC + P-407	$436,8 \pm 18,8$	$205,0 \pm 3,8$	$174,7 \pm 4,8$
CLO + P-407	$401,2 \pm 18,6$	$186,7 \pm 3,2$	$172,7 \pm 2,9$
HX + P-407	$436,0 \pm 24,9$	$198,2 \pm 9,2$	$182,8 \pm 5,4$

4.5.6 Efeito das partições n-butanólica (N-BUT), acetato (AC), clorofórmica (CLO) e hexânica (HX) obtidas a partir da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) sob os níveis plasmáticos de triglicerídeos em camundongos tratados com poloxamer (P-407).

Comparando-se as médias dos grupos P-407 1000mg/kg e controle, verificou-se um aumento bastante significativo dos níveis plasmáticos de TG (tabela 23) nas 24h ($10965,0 \pm 395,1\text{mg/dL}$ vs. $110,3 \pm 5,3\text{mg/dL}$), 48h ($7183,0 \pm 562,9\text{mg/dL}$ vs. $273,2 \pm 17,3\text{mg/dL}$) e 72h ($3637,0 \pm 344,8\text{mg/dL}$ vs. $246,8 \pm 22,7\text{mg/dL}$) de experimento, sendo mais relevante após 24h da injeção de poloxamer. Em termos percentuais esse aumento foi de 9841%, 2529% e 1373%, nos tempos 24h (figura 35a), 48h (figura 35b) e 72h (figura 35c), respectivamente.

No período de 24h, nenhuma das partições estudadas proporcionou uma redução significativa da concentração plasmática de triglicerídeos (tabela 23 e figura 35a).

Em relação ao tempo de 48h (figura 35b), diferentemente do que foi observado nas 24h, visualizaram-se reduções de TG em 24,3% e 25,8% com as partições clorofórmica ($5441,0 \pm 217,0\text{dL}$ vs. $7183,0 \pm 562,9\text{mg/dL}$) e hexânica ($5328,0 \pm 525,7\text{mg/dL}$ vs. $7183,0 \pm 562,9^{\text{a}}\text{mg/dL}$), respectivamente, comparando-se com o grupo P-407.

Como demonstrado na figura 35c e tabela 23, todas as partições estudadas, n-butanólica, acetato, clorofórmica e hexânica, no período de 72h, promoveram redução significativa dos níveis plasmáticos desse parâmetro bioquímico em 43,4%, 38,3%, 47,6% e 32,4%, respectivamente, quando comparado com o grupo P-407.

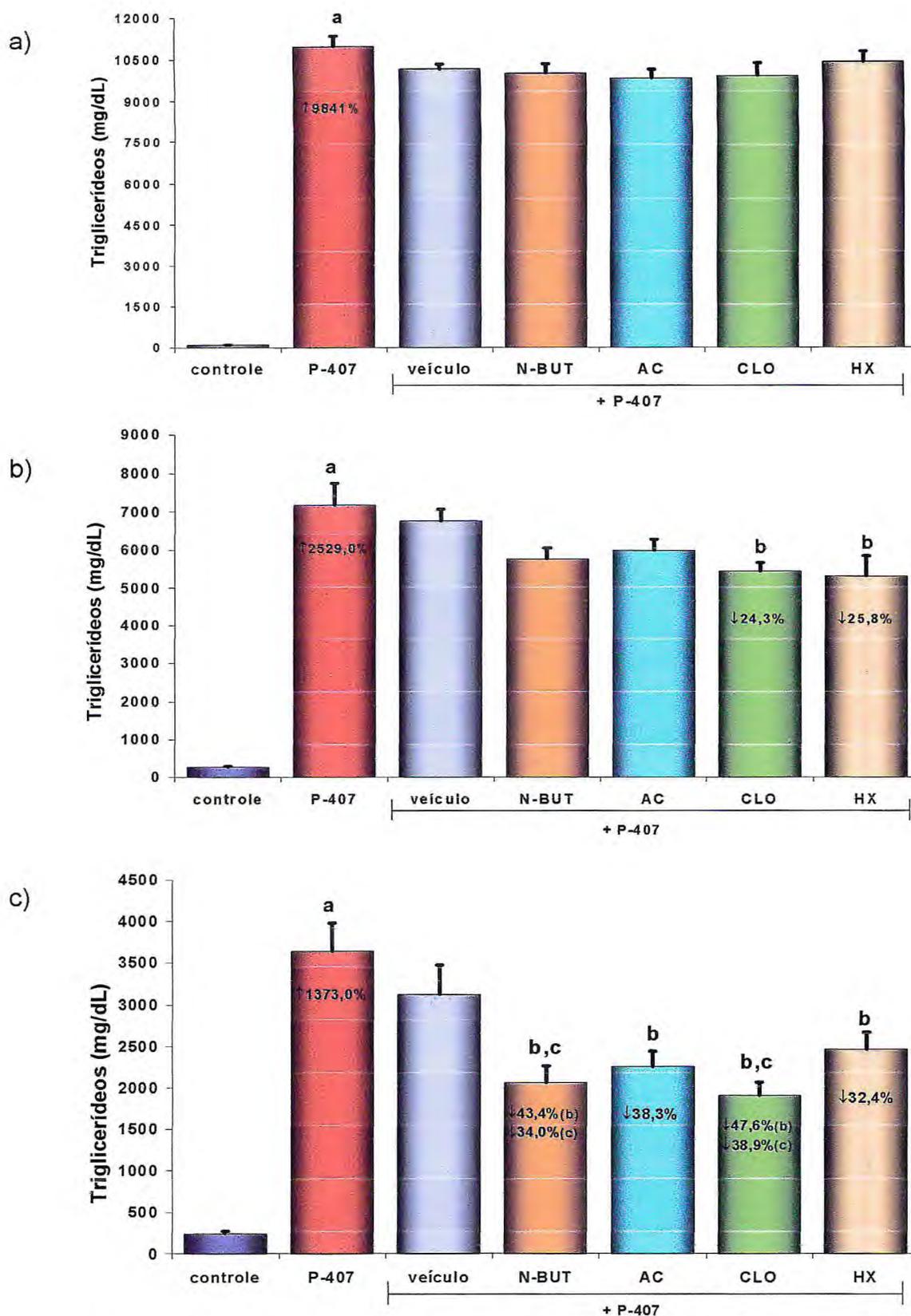


Figura 35. Efeito da administração das partições obtidas da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) na hipertrigliceridemia, após 24(a), 48(b) e 72h(c) da administração intraperitoneal de poloxamer. Os resultados dos grupos experimentais foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde P-407 = poloxamer-407 1000mg/kg; N-BUT = partição n-butanólica, AC = partição acetato, CLO = partição clorofórmica, HX = partição hexânica, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo P-407, c = $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (ANOVA e teste de Tukey).

Tabela 23. Níveis plasmáticos de triglicerídeos dos grupos tratados com salina (grupos controle e P-407), veículo ou partições (n-butanol, acetato, clorofórmio, hexano) após administração intraperitoneal de poloxamer-407. Os resultados dos experimentos (n=6) foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM), onde P-407 = poloxamer-407 1000mg/kg, VC = veículo, N-BUT = partição n-butanólica, AC = partição acetato de etila, CLO = partição clorofórmica, HX = partição hexânica, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo P-407, c = $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (ANOVA e teste de Tukey).

Grupos experimentais	Parâmetros Bioquímicos		
	Triglicerídeos (mg/dL) - 24h	Triglicerídeos (mg/dL) - 48h	Triglicerídeos (mg/dL) - 72h
Controle	110,3 \pm 5,3	273,2 \pm 17,3	246,8 \pm 22,7
P- 407	\uparrow 10965,0 \pm 395,1 ^a	\uparrow 7183,0 \pm 562,9 ^a	\uparrow 3637,0 \pm 344,8 ^a
VC + P-407	10151,0 \pm 172,8	6752,0 \pm 320,9	3122,0 \pm 348,0
N-BUT + P-407	10023,0 \pm 304,7	5773,0 \pm 279,4	\downarrow 2059,0 \pm 194,9 ^{b,c}
AC + P-407	9832,0 \pm 289,5	5990,0 \pm 304,1	\downarrow 2244,0 \pm 188,5 ^b
CLO + P-407	9913,0 \pm 400,4	\downarrow 5441,0 \pm 217,0 ^b	\downarrow 1907,0 \pm 155,7 ^{b,c}
HX + P-407	10362,0 \pm 339,2	\downarrow 5328,0 \pm 525,7 ^b	\downarrow 2457,0 \pm 201,1 ^b

4.5.7 Efeito das partições n-butanólica (N-BUT), acetato (AC), clorofórmica (CLO) e hexânica (HX) obtidas a partir da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) sobre os níveis plasmáticos de colesterol total em camundongos tratados com poloxamer (P-407).

Além do aumento significativo dos níveis plasmáticos de triglicerídeos, como demonstrado anteriormente, verificou-se uma elevação na concentração plasmática de colesterol total (tabela 24).

Comparando-se as médias dos grupos P-407 e controle, constatou-se um aumento do referido parâmetro em 482,3% (800,7 \pm 20,4mg/dL vs. 137,5 \pm 3,8mg/dL), 458,9% (749,5 \pm 28,9mg/dL vs. 134,0 \pm 4,6mg/dL) e 361,4% (547,7 \pm 44,1mg/dL vs. 118,7 \pm 3,9mg/dL), respectivamente, após 24h (figura 36a), 48h

(figura 36b) e 72h (figura 36c) da indução com poloxamer.

As partições estudadas não conseguiram reverter a hipercolesterolemia de forma significativa nos períodos de 24h e 48h de experimentação. Entretanto, nas 72h (figura 36c), verificou-se a presença de redução de CT em 34,0% ($547,7 \pm 44,1$ mg/dL vs. $361,5 \pm 12,6$ mg/dL) após o tratamento com a partição clorofórmica.

Tabela 24. Níveis plasmáticos de colesterol total dos grupos tratados com salina (grupos controle e P-407), veículo ou partições (n-butanol, acetato, clorofórmio, hexano) após administração intraperitoneal de poloxamer-407. Os resultados dos grupos experimentais (n=6) foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM), onde P-407 = poloxamer-407 1000mg/kg, VC = veículo, N-BUT = partição n-butanólica, AC = partição acetato de etila, CLO = partição clorofórmica, HX = partição hexânica, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo P-407, c = $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo. (ANOVA e teste de Tukey).

Grupos experimentais	Parâmetros Bioquímicos		
	Colesterol total (mg/dL) - 24h	Colesterol total (mg/dL) - 48h	Colesterol total (mg/dL) - 72h
Controle	137,5 \pm 3,8	134,0 \pm 4,6	118,7 \pm 3,9
P- 407	\uparrow 800,7 \pm 20,4 ^a	\uparrow 749,5 \pm 28,9 ^a	\uparrow 547,7 \pm 44,1 ^a
VC + P-407	796,0 \pm 12,2	732,5 \pm 30,9	498,5 \pm 24,8
N-BUT + P-407	793,8 \pm 19,1	738,7 \pm 28,0	454,5 \pm 22,9
AC + P-407	795,2 \pm 14,8	760,8 \pm 19,2	461,0 \pm 26,5
CLO + P-407	730,0 \pm 12,6	688,2 \pm 22,4	\downarrow 361,5 \pm 12,6 ^{b,c}
HX + P-407	792,3 \pm 23,9	722,5 \pm 26,7	439,5 \pm 27,3

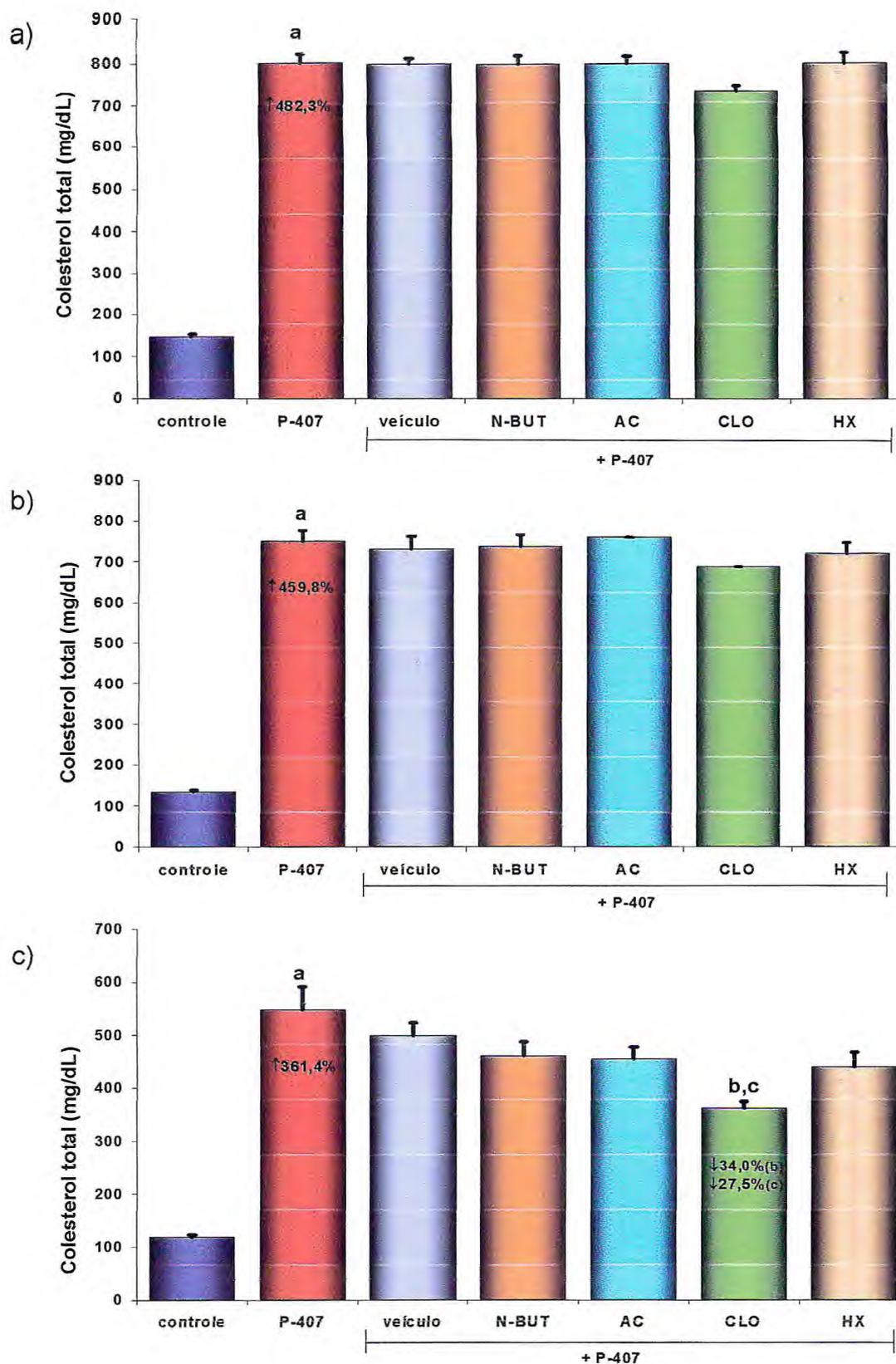


Figura 36. Efeito da administração das partições obtidas da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (SABO) na hipercolesterolemia, após 24(a), 48(b) e 72h (c) da administração intraperitoneal de poloxamer. Os resultados (n=6) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde P-407 = poloxamer-407 1000mg/kg; N-BUT = partição n-butanólica, AC = partição acetato, CLO = partição clorofórmica, HX = partição hexânica, a = $p < 0,05$ em relação ao controle, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo P-407, c = $p < 0,05$ em relação ao veículo (ANOVA e teste de Tukey).

4.6 PROTOCOLO DE HIPERCOLESTEROLEMIA INDUZIDA POR RAÇÃO HIPERCALÓRICA

Todos os camundongos foram alimentados com a ração hipercalórica, exceto os do grupo controle, que ingeriram ração padrão. Após a ingestão da ração modificada por duas semanas, constatou-se uma elevação significativa dos níveis plasmáticos de colesterol total dos grupos ração hipercalórica ($219,3 \pm 6,4\text{mg/dL}$), sinvastatina ($210,8 \pm 4,7 \text{ mg/dL}$), SABO 200 ($214,2 \pm 4,9\text{mg/dL}$), SABO 400 ($224,2 \pm 3,3\text{mg/dL}$), SABO 800 ($207,8 \pm 10,5\text{mg/dL}$) quando comparado ao grupo ração padrão ($125,8 \pm 4,9\text{mg/dL}$). Os demais grupos experimentais tais como veículo ($214,2 \pm 6,3\text{mg/dL}$), CLO 1 ($220,2 \pm 3,2\text{mg/dL}$), CLO 2 ($222,8 \pm 2,9\text{mg/dL}$) e CLO 3 ($214,5 \pm 8,1\text{mg/dL}$) também ficaram hipercolesterolêmicos.

4.6.1 Efeito da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* e sua partição clorofórmica sobre o metabolismo lipídico e glicêmico em camundongos com hipercolesterolemia induzida por ração hipercalórica.

Após a identificação da indução da hipercolesterolemia nos animais, iniciou-se o tratamento dos grupos experimentais, mantendo-se a ração modificada para todos os grupos com exceção do controle. Ao final do protocolo experimental, ou seja, transcorridos 4 semanas de tratamento (tabela 25) com as drogas em estudo, a hipercolesterolemia foi na ordem de 64,8% ($239,8 \pm 6,4\text{mg/dL}$ vs. $145,5 \pm 6,8\text{mg/dL}$) (figuras 37a e 37b).

A administração diária por via oral de SABO 200 ($215,2 \pm 4,2\text{mg/dL}$), SABO 400 ($220,2 \pm 2,2\text{mg/dL}$) e SABO 800 ($213,0 \pm 7,6\text{mg/dL}$) promoveram redução dos níveis de colesterol total, após 28 dias de tratamento, em 10,3%, 8,3% e 11,2%, respectivamente, se comparado com o grupo ração hipercalórica ($239,8 \pm 6,4\text{mg/dL}$) (figura 37a).

Além disso, a sinvastatina 10mg/kg, fármaco hipocolesterolêmico utilizado na prática médica, foi capaz de promover uma redução mais acentuada do que os grupos tratados com SABO que foi de 12,6% (figuras 37a e 37b). Em relação à partição clorofórmica (figura 37b), somente a dose de 9,2mg/kg (CLO 3) demonstrou

efeito redutor nos níveis desse lipídeo que foi de 16,7%, sendo, portanto mais efetiva que a sinvastatina 10mg/kg.

Dessa forma, pode-se perceber claramente que a SABO 800 mg/kg e a fração clorofórmica 9,2mg/kg (CLO 3), dentre as demais doses testadas, foram tão efetivas quanto a sinvastatina, sendo que a CLO 3 demonstrou melhores resultados.

Os níveis de triglicerídeos de todos os grupos experimentais que ingeriram a ração hipercalórica diminuíram após 28 dias de tratamento. A redução foi de 46,4% - RH ($102,0 \pm 7,2$ mg/dL), 51,0% - sinvastatina ($93,3 \pm 14,3$ mg/dL), 51,7% - veículo ($91,8 \pm 4,4$ mg/dL), 49,5% - SABO 200 ($96,2 \pm 12,0$ mg/dL), 46,5% - SABO 400 ($101,8 \pm 4,2$ mg/dL), 39,8% - SABO 800 ($114,7 \pm 9,4$ mg/dL) (tabela 25 e figura 38a).

Em relação aos animais dos grupos tratados com a partição clorofórmica, o decréscimo de TG foi de 46,3% - CLO 1 ($102,2 \pm 7,0$ mg/dL), 43,9% - CLO 2 ($106,8 \pm 9,1$ mg/dL) e 45,5% - CLO 3 ($103,8 \pm 7,3$ mg/dL). Os percentuais de redução de TG foram calculados baseando-se na média do grupo ração padrão ($199,3 \pm 11,5$ mg/dL) (tabela 25 e figura 38b).

No que diz respeito ao metabolismo glicêmico, a ingestão da ração modificada não foi capaz de promover alterações significativas, comparando-se os grupos ração padrão ($137,7 \pm 3,2$ mg/dL) e ração hipercalórica ($158,7 \pm 6,8$ mg/dL). Além disso, as doses tanto de suspensão como de partição clorofórmica também não modificaram os níveis plasmáticos de glicose (tabela 25).

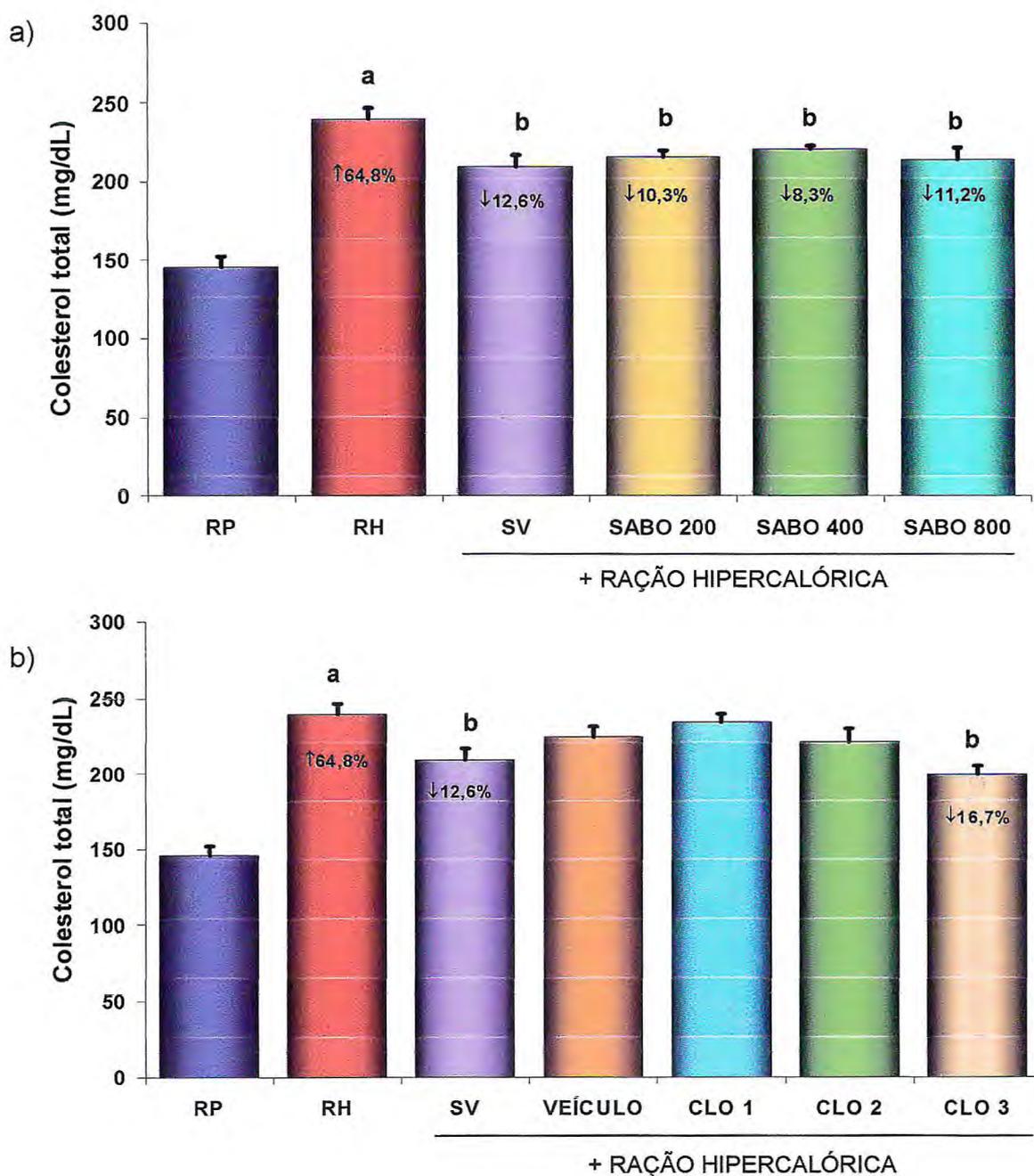


Figura 37. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (a) e sua partição clorofórmica (b) nos níveis de colesterol total no protocolo da dieta hipercalórica. Os resultados (n=6) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde RP= ração padrão; RH = ração hipercalórica, SV = sinvastatina 10mg/kg, SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = SABO 800mg/kg, CLO1 = partição clorofórmica 2,3mg/kg, CLO 2 = partição clorofórmica 4,6mg/kg, CLO 3 = partição clorofórmica 9,2mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo RP, b = $p < 0,05$ em relação ao grupo RH (ANOVA e teste de Newman-Keuls).

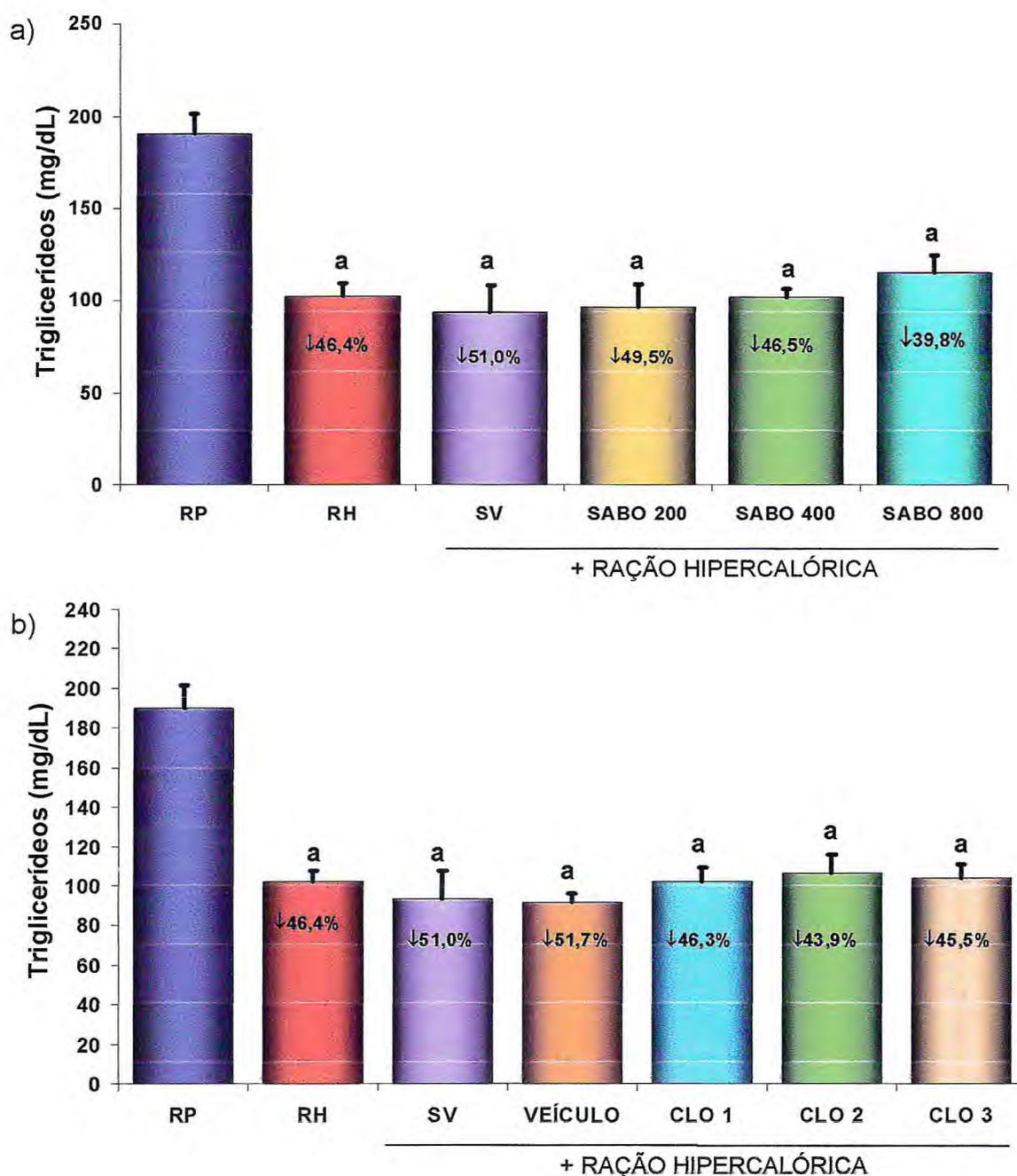


Figura 38. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* (a) e sua partição clorofórmica (b) nos níveis plasmáticos de triglicerídeos no protocolo da dieta hipercalórica. Os resultados (n=6) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde RP= ração padrão; RH = ração hipercalórica, SV = sinvastatina 10mg/kg, SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = SABO 800mg/kg, CLO1 = partição clorofórmica 2,3mg/kg, CLO 2 = partição clorofórmica 4,6mg/kg, CLO 3 = partição clorofórmica 9,2mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo RP (ANOVA e teste de Newman-Keuls).

Tabela 25. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* e sua partição clorofórmica nos níveis plasmáticos de glicose, colesterol total e triglicerídeos no protocolo da dieta hipercalórica. Os resultados (n=6) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde RP= ração padrão; RH = ração hipercalórica, SV = sinvastatina 10mg/kg, SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = SABO 800mg/kg, CLO1 = partição clorofórmica 2,3mg/kg, CLO 2 = partição clorofórmica 4,6mg/kg, CLO 3 = partição clorofórmica 9,2mg/kg, a = $p < 0,05$ em relação ao grupo RP (ANOVA e teste de Newman-Keuls).

Grupos experimentais	Parâmetros bioquímicos		
	Glicose (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)
RP	137,7 \pm 3,2	145,5 \pm 6,4	199,3 \pm 11,5
RH	158,7 \pm 6,8	\uparrow 239,8 \pm 6,8 ^a	\downarrow 102,0 \pm 7,2 ^a
SV + RH	149,3 \pm 9,2	\downarrow 209,0 \pm 7,2 ^b	\downarrow 93,3 \pm 14,3 ^a
VEÍCULO + RH	161,3 \pm 8,3	224,3 \pm 7,1	\downarrow 91,8 \pm 4,4 ^a
SABO 200 + RH	146,0 \pm 8,9	\downarrow 215,2 \pm 4,2 ^b	\downarrow 96,2 \pm 12,0 ^a
SABO 400 + RH	155,7 \pm 4,8	\downarrow 220,0 \pm 2,2 ^b	\downarrow 101,8 \pm 4,2 ^a
SABO 800 + RH	162,0 \pm 4,7	\downarrow 213,0 \pm 7,6 ^b	\downarrow 114,7 \pm 9,4 ^a
CLO 1 + RH	168,2 \pm 9,4	233,8 \pm 5,8	\downarrow 102,2 \pm 7,0 ^a
CLO 2 + RH	164,8 \pm 10,8	221,0 \pm 8,8	\downarrow 106,8 \pm 9,1 ^a
CLO 3 + RH	166,2 \pm 15,0	\downarrow 199,8 \pm 5,5 ^b	\downarrow 103,8 \pm 7,3 ^a

4.6.2 Efeito da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* e sua partição clorofórmica sobre a função renal, hepática e pancreática em camundongos com hipercolesterolemia induzida por ração hipercalórica.

Os grupos que ingeriram ração modificada não demonstraram alterações nos níveis de AST, exceto para os animais tratados com CLO 1, CLO 2 e CLO3, conforme pode ser visualizado na figura 39. Esse aumento em percentual foi de 20,2%, 23,9% e 24,2% para os grupos CLO 1 (106,8 \pm 5,4mg/dL), CLO 2 (110,0 \pm

3,8mg/dL) e CLO 3 ($110,3 \pm 4,3\text{mg/dL}$), respectivamente, quando comparado ao grupo ração padrão ($88,8 \pm 7,4\text{mg/dL}$). Dessa forma, percebe-se que a ração hipercalórica por si só, não foi capaz de promover alterações nesse parâmetro bioquímico de forma significativa.

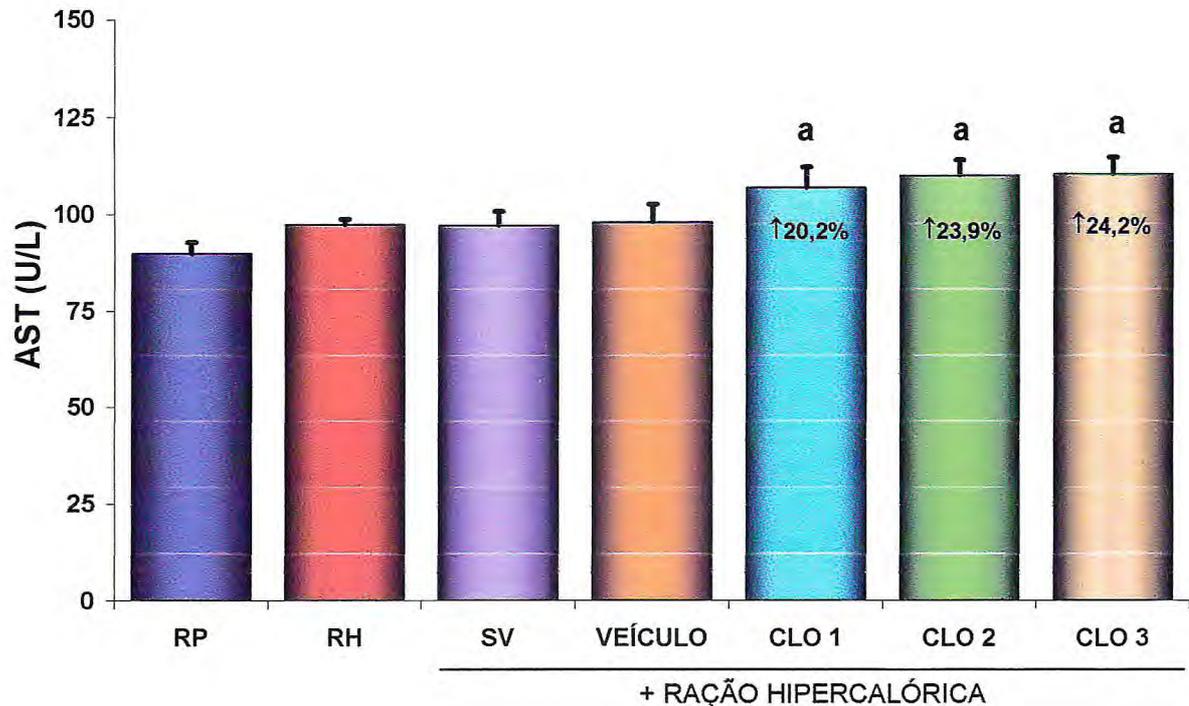


Figura 39. Efeito da administração da partição clorofórmica nos níveis plasmáticos de AST no protocolo da dieta hipercalórica. Os resultados ($n=6$) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde RP= ração padrão; RH = ração hipercalórica, SV = sinvastatina 10mg/kg, CLO1 = partição clorofórmica 2,3mg/kg, CLO 2 = partição clorofórmica 4,6mg/kg, CLO 3 = partição clorofórmica 9,2mg/kg, a = $p<0,05$ em relação ao grupo RP (ANOVA e teste de Newman-Keuls).

Conforme a tabela 26 verifica-se que a média dos demais parâmetros determinados tais como ALT, uréia, creatina, amilase e lipase não foi modificada, demonstrando que a ração hipercalórica bem como a suspensão e sua partição não conferem alterações nas funções hepática, renal e pancreática; com exceção do caso da AST que já foi descrito.

Tabela 26. Efeito da administração da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* e sua partição clorofórmica na função renal hepática e pancreática no protocolo da dieta hipercalórica. Os resultados (n=6) foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde RP = ração padrão; RH = ração hipercalórica, SV = sinvastatina 10mg/kg, SABO 200 = SABO 200mg/kg, SABO 400 = SABO 400mg/kg, SABO 800 = SABO 800mg/kg, CLO 1 = partição clorofórmica 2,3mg/kg, CLO 2 = partição clorofórmica 4,6mg/kg, CLO 3 = partição clorofórmica 9,2mg/kg (ANOVA e teste de Newman-Keuls).

Grupos experimentais	Parâmetros Bioquímicos					
	AST (U/L)	ALT (U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Amilase (U/L)	Lipase (U/L)
RP	88,8 \pm 7,4	44,67 \pm 3,3	46,8 \pm 3,3	0,303 \pm 0,02	262,0 \pm 7,8	645,5 \pm 7,7
RH	97,3 \pm 3,8	50,8 \pm 4,2	47,2 \pm 1,7	0,332 \pm 0,03	274,6 \pm 2,8	655,5 \pm 2,8
SV + RH	97,2 \pm 8,6	49,67 \pm 3,6	48,0 \pm 1,6	0,335 \pm 0,03	256,9 \pm 8,9	637,7 \pm 3,9
VEÍCULO + RH	98,0 \pm 4,6	55,67 \pm 4,8	52,2 \pm 1,1	0,352 \pm 0,03	253,2 \pm 13,7	640,4 \pm 4,7
SABO 200 + RH	91,8 \pm 2,4	53,8 \pm 4,3	44,8 \pm 1,2	0,337 \pm 0,02	267,2 \pm 2,1	646,4 \pm 5,1
SABO 400 + RH	97,2 \pm 14,8	57,0 \pm 2,5	48,0 \pm 1,1	0,339 \pm 0,02	251,0 \pm 13,8	638,5 \pm 1,9
SABO 800 + RH	103,5 \pm 7,0	44,7 \pm 1,4	48,0 \pm 1,9	0,352 \pm 0,05	265,0 \pm 14,2	639,5 \pm 2,7
CLO 1 + RH	\uparrow 106,8 \pm 5,4 ^a	54,0 \pm 4,1	51,3 \pm 2,2	0,292 \pm 0,02	275,0 \pm 4,2	636,6 \pm 3,2
CLO 2 + RH	\uparrow 110,0 \pm 3,8 ^a	51,5 \pm 3,1	47,3 \pm 2,3	0,318 \pm 0,03	255,9 \pm 11,9	638,2 \pm 4,0
CLO 3 + RH	\uparrow 110,3 \pm 4,3 ^a	43,5 \pm 3,1	53,0 \pm 1,8	0,337 \pm 0,02	249,2 \pm 9,7	649,6 \pm 2,5



**D I S C U S S Ã O
D O S
R E S U L T A D O S**

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A utilização de plantas com fins medicinais para o tratamento, a cura e a prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, apesar de suas possíveis atividades curativas serem amplamente propagadas por usuários ou comerciantes (VEIGA-JÚNIOR *et.al.*, 2005).

Do ponto de vista científico, pesquisas têm demonstrado que muitos desses vegetais possuem substâncias potencialmente deletérias, indicando a necessidade de estudos relacionados aos seus possíveis efeitos tóxicos (BABAYI *et.al.*, 2007).

Estudos toxicológicos relacionados a aditivos alimentares tem sido alvo de investigações científicas. As preocupações relacionadas ao impacto da utilização de corantes sintéticos sobre a saúde direcionam as atenções para o uso daqueles de origem natural, pela crença de que estes últimos sejam desprovidos de efeitos maléficos (COSTA & CHAVES, 2005).

Verifica-se a inexistência de estudos aprofundados referentes às análises toxicológicas e químicas para o registro de aditivos alimentares oriundos de fontes naturais. Dessa forma, a escassez de informações relativas a possíveis efeitos deletérios e/ou atividades farmacológicas decorrentes do uso desses aditivos é preocupante diante da importância do referido tema (PAUMGARTTEN *et.al.*, 2002; HALLAGAN *et.al.*, 1995).

Entre os corantes naturais conhecidos, os pigmentos oriundos das sementes de *Bixa orellana* despontam como um dos mais importantes, uma vez que têm sido utilizados em várias partes do mundo, em escala industrial, por conferir coloração atraente a uma extensa gama de produtos manufaturados (COSTA & CHAVES, 2005; FELICISSIMO *et.al.*, 2004)

Além da finalidade de corante, as sementes de *Bixa orellana* são largamente empregadas pela população para tratar diversas patologias (PAUMGARTTEN *et.al.*,

2002; SHILPI *et.al.*, 2006; RIVIERA-MADRID *et.al.*, 2006; LIMA *et.al.*, 2006). Especialmente no estado do Ceará, Nordeste do Brasil, essas sementes tem sido utilizadas para redução dos níveis séricos de lipídeos (FERREIRA *et.al.*, 2008). Nos últimos anos, de acordo com estudos científicos publicados em congressos pelo nosso grupo de pesquisa, tem-se verificado potencialidades terapêuticas com preparações aquosas e etanólicas dessas sementes no tratamento de dislipidemias induzidas farmacologicamente, o que confirma a observação dos adeptos da medicina alternativa (FERREIRA *et.al.*, 2007a e 2007c).

De acordo com a população do estado do Ceará, as sementes de *Bixa orellana* são utilizadas inteiras (*in natura*), na forma de chás ou decoctos, sendo mais empregada a primeira situação. Portanto, optou-se pela realização de uma suspensão aquosa dessas sementes para tentar reproduzir a sua utilização, de acordo com as indicações dos adeptos da medicina alternativa. Além disso, em estudos realizados no Laboratório de Bioquímica Clínica da UFC verificou-se uma redução mais acentuada após tratamento com a suspensão aquosa quando comparado com o extrato etanólico das sementes de *Bixa orellana*, sugerindo maior potencialidade terapêutica da primeira preparação (FERREIRA *et.al.*, 2007a e 2007b).

Para a realização dos protocolos experimentais do presente estudo foram avaliadas três doses da suspensão aquosa das sementes de urucum: 200mg/kg, 400mg/kg e 800mg/kg, exceto para o teste do *up-and-down* no qual se estudou as doses de 2000 e 5000mg/kg. Não foram utilizadas concentrações superiores as estudadas devido ao fator limitante de doses maiores possuírem grande quantidade de resíduo, o que dificultaria e inviabilizaria o processo de administração nos animais por via oral (gavagem). Isso só foi possível no teste de toxicidade oral aguda, uma vez que as SABO 2000 e 5000mg/kg, puderam ser administradas em intervalos desde que não ultrapassasse o período de 24h.

Toxicidade oral aguda pelo teste do up-and-down

O teste do *up-and-down* foi realizado preliminarmente como uma forma de identificar possíveis mortes dos animais além de sinais de toxicidade, após 60min, 24h e 14 dias da administração da SABO. Existem muitas variantes no delineamento experimental desse teste relacionado à estimativa da DL₅₀. Como preconizado pela OECD 425, se não há informações sobre o potencial tóxico de determinada substância, sugere-se o início dos estudos com 175mg/kg e a utilização da escala *log* para cálculo das demais doses. Esse ponto de partida pode ser modificado para concentrações menores, caso a substância tenha uma elevada toxicidade. Além disso, o teste do *up-and-down* é dividido em dois: o teste limite e o teste principal, cuja escolha vai depender das informações toxicológicas prévias do material a ser estudado (OECD 425).

O teste limite, cujo tratamento é realizado com as doses de 2000mg/kg e 5000mg/kg, deve ser escolhido nos casos em que existem informações toxicológicas prévias da substância teste, enquanto que na ausência de registros, a metodologia de eleição é o teste principal. Nesse último, a dose a ser administrada nos animais subsequentes é ajustada para cima ou para baixo de acordo com o resultado encontrado no animal anterior (OECD 425). A investigação toxicológica foi conduzida com o teste limite, uma vez que estudos anteriores com os corantes bixina e norbixina têm demonstrado baixo potencial tóxico às sementes de *Bixa orellana* (PAUMGARTTEN *et.al.*, 2002; HAGIWARA *et.al.*, 2003; BAUTISTA *et.al.*, 2004).

Após o tratamento com a SABO nas doses de 2000mg/kg e 5000mg/kg não foi evidenciado nenhum sinal de toxicidade oral aguda nem mortes dos animais em experimentação. Além disso, nas análises histológicas dos órgãos fígado, rim e coração não foram visualizadas alterações significativas indicativas de processo degenerativo. Esses resultados demonstram que a DL₅₀ estimada dessa suspensão é maior que 5000mg/kg, indicando que altas doses são bem toleradas em curto prazo. Além disso, proporciona uma maior segurança para a realização do teste de toxicidade de doses repetidas por 30 e 90 dias como preconizado pela ANVISA (RE nº 90), de modo a não conferir dor nem sofrimento aos animais em experimentação.

Toxicidade oral de doses repetidas

Como descrito por Babayi *et.al.* (2007), algumas preparações de ervas medicinais, drogas convencionais e substâncias químicas podem afetar vários componentes sanguíneos. Alterações da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas podem expressar sinais de toxicidade (FLAMMANG *et.al.*, 2007). A partir desse pressuposto, o acompanhamento de todas as variáveis mencionadas é de grande importância em estudos de toxicidade.

A avaliação toxicológica com doses repetidas (30 e 90 dias de tratamento) demonstrou que a suspensão aquosa de *Bixa orellana* na dose de 800mg/kg promoveu um aumento significativo dos níveis plasmáticos de glicose. Entretanto, esse aumento não demonstra a presença de um quadro de diabetes nos animais desse grupo, uma vez que, de acordo com os inúmeros protocolos experimentais realizados para avaliação do efeito hipoglicemiante de substâncias, considera-se diabético o animal que apresentar glicemia igual ou maior que 180mg/dL (ASGARY *et.al.*, 2008) ou 250mg/dL (QI *et.al.*, 2008). Além disso, animais diabéticos manifestam sinais tais como poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso e, no presente estudo, nenhuma dessas características foram identificadas. Uma provável hipótese seria que os animais tratados com a maior dose de SABO poderiam estar desenvolvendo uma intolerância à glicose, visto que nessa situação os sinais descritos ainda não são evidentes. Contudo, mesmo com a visualização do aumento glicêmico, não se pode definir com exatidão quais os mecanismos acarretaram o desequilíbrio do metabolismo desse carboidrato.

Na investigação científica conduzida por Bautista *et.al.* (2004), a administração de extrato de *Bixa orellana* (27% de bixina), na dose de 2000mg/kg, por 28 dias, proporcionou uma elevação significativa da glicemia de ratos machos e fêmeas corroborando com os achados do presente estudo.

Entretanto, os achados de Fernandes *et.al.* (2002) foram bastante divergentes no que diz respeito ao parâmetro glicose. Esses autores demonstraram que a administração contínua de norbixina em roedores promoveu uma hiperglicemia nos ratos e hipoglicemia em camundongos. Os autores sugerem que esse efeito tenha

ocorrido pela possível interação da norbixina com a membrana plasmática. A alteração da permeabilidade da membrana à glicose pode ter afetado a atividade intrínseca do receptor GLUT, resultando em redução da captação de glicose e, conseqüentemente, desencadeado uma hiperglicemia (FERNANDES *et.al*, 2002).

Como descrito por Rhiouani *et.al.* (2008), as diferenças entre as espécies no que diz respeito à farmacocinética torna difícil a extensão dos efeitos adversos visualizados em animais para humanos. Assim, pode-se inferir que, de acordo com a espécie animal utilizada, substâncias contidas nas sementes de *Bixa orellana* podem proporcionar efeitos glicêmicos distintos, sendo de grande importância a realização de outros estudos para avaliação da real potencialidade terapêutica e /ou interferência no metabolismo dos carboidratos.

Alterações na concentração dos principais lipídeos séricos como colesterol, colesterol-HDL, colesterol-LDL e triglicerídeos podem fornecer informações valiosas no que diz respeito ao metabolismo lipídico, predisposição a aterosclerose e a associação desta com doenças arteriais coronarianas (ASHAFA *et.al.*, 2009; YAKUBU *et.al.*, 2007).

Em estudos desenvolvidos por Bautista *et.al.* (2004), verificou-se um aumento dos níveis plasmáticos de triglicerídeos de animais tratados com extratos obtidos das sementes de *Bixa orellana*. Esses resultados discordam dos encontrados no presente trabalho, uma vez que os parâmetros bioquímicos colesterol total, triglicerídeos e colesterol-HDL não sofreram alterações com a administração da SABO nas doses estudadas. Tais resultados sugerem que o tratamento a curto (30 dias) e longo prazo (90 dias) com a suspensão das sementes de *Bixa orellana* não ocasiona um desequilíbrio no metabolismo basal dos lipídeos. Pode-se ainda sugerir que a suspensão em estudo não afeta a homeostasia da biossíntese do colesterol e os estoques de triacilgliceróis (ASHAFA *et.al.*, 2009), o que diminui a predisposição dos animais a aterosclerose e doenças cardiovasculares.

Fígado e rins são os principais órgãos investigados em animais utilizados em protocolos experimentais de toxicidade. Tais estruturas anatômicas foram analisadas em camundongos e ratos tratados com pigmentos de *Bixa orellana*, uma vez que

integridade funcional desses é de vital importância para a manutenção da homeostase corpórea (FERNANDES *et.al.*, 2002). Algumas plantas medicinais têm demonstrado efeitos hepato e nefrotóxicos, sendo que o dano causado a esses órgãos normalmente resultam em elevações de parâmetros bioquímicos como AST, ALT, fosfatase alcalina, uréia e creatinina (BABAYI *et.al.*, 2007; NYARKO *et.al.*, 2005).

Creatinina, uréia e ácido úrico são os principais produtos do catabolismo do músculo, proteína e metabolismo das purinas, respectivamente. Como esses compostos são excretados na urina, o quadro de disfunção renal está geralmente associado ao aumento da concentração plasmática dessas substâncias (MOTA, 2003). O aumento da creatinina e uréia sérica em estudos experimentais pode ser atribuído à diminuição da capacidade funcional de depuração dos rins (AFOLAYAN *et.al.*, 2009; ANIAGU *et.al.*, 2005).

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram que nenhum dos parâmetros utilizados para avaliação da função renal foi alterado de forma significativa após o tratamento com a SABO. Dessa forma, pode-se sugerir que essa suspensão parece não interferir na capacidade de excreção renal dos metabólitos, refletindo uma preservação da integridade da função renal dos animais tratados.

Esses resultados não apresentaram similaridade com os demonstrados por Fernandes *et.al.* (2002), que encontraram redução significativa dos níveis plasmáticos de creatinina, em camundongos, após tratamento com norbixina 66mg/kg. Entretanto, esses mesmos autores não observaram alterações significativas nos parâmetros uréia e creatinina em ratos tratados com norbixina ou extrato de urucum, quando comparado com o grupo controle, corroborando com os achados do presente estudo.

Espécies químicas como os eletrólitos inorgânicos estão presentes em grandes quantidades tanto no fluido intracelular como no extracelular. Eles compreendem um importante fator de transferência de água entre os compartimentos celulares (ZILVA *et.al.*, 1991). A ausência de efeito sobre os

eletrólitos sódio, potássio e cloreto nos animais tratados com SABO pode sugerir que os processos dependentes desses íons não foram adversamente afetados.

Portanto, a ausência de alterações dos parâmetros bioquímicos uréia, creatina e ácido úrico bem como nos eletrólitos dão suporte para a inferência de que a ingestão dessa suspensão parece manter a integridade tanto dos glomérulos como dos túbulos renais. Essa afirmativa é embasada, também, pelas análises histológicas do rim, pois nenhuma degeneração macro e microscópica foi identificadas nessas estruturas renais.

Há algumas enzimas tais como fosfatases, desidrogenases e transferases que, normalmente, não são encontradas no plasma ou estão presentes nesse em pequenas quantidades. Entretanto, durante o dano tecidual elas aparecem no soro, provavelmente pelo seu extravasamento da célula de origem (WILLS, 1985; PANDA, 1989). Portanto, a determinação da atividade das enzimas no plasma é uma importante ferramenta de diagnóstico, uma vez que fornece informações sobre os efeitos patológicos e a natureza do dano ao tecido de origem (AKANJI & YAKUBU, 2000).

As aminotransferases, AST e ALT, são consideradas indicadores sensíveis de lesão hepatocelular, fornecendo uma avaliação quantitativa do grau do dano proporcionado ao fígado (AL-HABORI *et al.*, 2002). Como a ALT é uma enzima predominantemente citosólica, qualquer perturbação na membrana plasmática das células hepáticas irá, conseqüentemente, elevar os níveis dessa enzima no soro. Em relação à AST, cerca de 80% dela encontra-se na mitocôndria. Diferentemente da ALT a AST está presente em muitos órgãos (músculo cardíaco e esquelético) além do fígado, sendo o seu aumento sugestivo tanto de danos hepáticos como musculares (KANAAAN *et al.*, 2008).

Com os resultados obtidos, verificou-se que os níveis séricos de AST e fosfatase alcalina permaneceram reduzidos de forma significativa, quando comparado com o grupo controle, durante os 30 e 90 dias de tratamento com SABO. Entretanto, os níveis de ALT decaíram nos 30 dias iniciais retornando aos mesmos níveis do grupo controle, após 90 dias.

O presente estudo demonstra que a SABO, em algumas doses, diminuiu a atividade da AST e ALT plasmática, o que pode implicar a inibição dessas enzimas, bem como o efeito competitivo de substâncias presentes na suspensão pelo substrato das aminotransferases. Além disso, o exame histológico do fígado não demonstrou danos aos hepatócitos, sugerindo que a suspensão nas doses estudadas possivelmente não possui propriedades tóxicas, o que complementa os achados bioquímicos.

Sabe-se que a resposta do fígado a qualquer forma de obstrução na árvore biliar é o aumento da produção e da atividade plasmática da fosfatase alcalina. Seu principal sítio de síntese enzimática é o hepatócito localizado na região adjacente ao canalículo biliar. No caso de obstruções extra-hepáticas verifica um aumento marcante dessa enzima, sendo um dos exemplos a presença de cálculos (KANAAN *et.al.*, 2008). Portanto, a redução da concentração plasmática de fosfatase alcalina sugere que não ocorreu colestase (ANIAGU *et.al.*, 2005) nos grupos tratados com SABO.

A maioria das proteínas plasmáticas, à exceção das imunoglobulinas e hormônios de natureza protéica, é sintetizada pelo fígado (KANAAN *et.al.*, 2008). Dentre todas as proteínas encontradas em nosso organismo, a albumina desponta em relação às demais por ser a mais abundante (cerca de 50% do total) e, conseqüentemente, ter um grande papel no equilíbrio e manutenção da pressão coloidsmótica entre o espaço intracelular e o líquido intersticial (BURTIS *et.al.*, 2008).

Como os valores de albumina e proteínas totais não foram alterados, de forma significativa, pela ingestão de SABO, sugere-se que a função de síntese e secretória do fígado permaneceu inalterada. Todavia, segundo Hagiwara *et al.* (2003) foi verificado um aumento dos níveis plasmáticos de ambos os parâmetros do metabolismo protéico, após tratamento com norbixina incorporada na dieta, divergindo dos resultados aqui descritos. Mas, em estudos conduzidos por Fernandes *et. al.* (2002) também com norbixina, não foram evidenciadas alterações nos níveis de proteínas totais, o que corrobora com os achados do presente estudo.

O sistema hematopoiético é um dos alvos mais sensíveis aos compostos tóxicos (MUKINDA & SYCE, 2007) e um índice importante de avaliação do estado fisiológico e patológico no homem e animais (ADENEYE *et. al.*, 2006). Portanto, o hemograma tem sido uma fonte de informações em estudos pré-clínicos toxicológicos (OLSON *et.al.*, 2000) e pode ser dividido em eritrograma (células vermelhas), leucograma (células brancas) e plaquetograma (plaquetas).

Os índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM, bem como o número de hemácias, quando em níveis normais, indicam a ausência de destruição das células vermelhas e problemas na incorporação da hemoglobina, sendo este último achado, sugestivo de ausência de anemia (ODEYEMI *et.al.*, 2009). Além disso, a manutenção do número de neutrófilos e linfócitos é um forte indicador que não ocorreu processos inflamatórios nem modificações no sistema imunológico (ASHAFA *et.al.*, 2009; YAKUBU *et.al.*, 2007).

A vantagem da confecção de esfregaços sanguíneos é que algumas células podem ser contadas de forma errada em procedimentos automáticos, principalmente, em estudos com animais, devido à predominância de linfócitos (cerca de 90%) em ratos. Esse perfil é bem diferente da contagem diferencial em humanos nos quais prevalecem os neutrófilos.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a SABO, nas doses estudadas, não afetou os parâmetros analisados no hemograma. Este fato sugere que a suspensão não é tóxica para a circulação dos glóbulos vermelhos, nem interfere na sua produção. A ausência de alterações nos índices hematimétricos implica que a SABO parece não afetar a incorporação de hemoglobina nos eritrócitos. Além disso, na contagem diferencial dos leucócitos verificaram-se valores de linfócitos e neutrófilos compatíveis com o grupo controle, indicando homeostase do sistema imune e ausência de processo inflamatório.

Os sinais de toxicidade sistêmica são definidos a partir da redução da massa corporal dos animais experimentais. Além da redução do desenvolvimento, a toxicidade sistêmica nos animais se manifesta através da redução nos consumos de água e ração, alterações de comportamento, apatia e má condição da pelagem, como a presença de pêlos arrepiados (RAUBER *et.al.*, 2006). Um indicador sensitivo

de órgãos atingidos por possíveis espécies tóxicas que tem sido utilizado é o aumento ou redução do peso desses (absoluto ou relativo) (BABAYI *et.al.*, 2007).

No presente estudo, o ganho de massa corpórea, bem como a ingestão de ração e água permaneceram similares aos valores do grupo controle ao longo dos 90 dias de tratamento, implicando que a SABO em doses de até 800mg/kg foram bem toleradas pelos animais. Esses resultados confirmam que a hiperglicemia induzida pela SABO 800mg/kg não se trata de um quadro de diabetes, pois esse distúrbio no metabolismo dos carboidratos está associado com perda de peso, aumento do consumo de água e ração, além de poliúria, conforme descrito anteriormente.

O aumento ou a diminuição do peso dos órgãos (absoluto ou relativo) tem sido observado como indicador de toxicidade (DIOKA *et.al.*, 2002). A administração oral crônica de SABO não alterou a morfologia macroscópica dos órgãos dos animais em estudo, confirmando a ausência de alterações nos parâmetros bioquímicos estudados.

A suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* não promoveu diferenças significantes no peso absoluto do fígado, rins, coração e pulmão, entre os grupos experimentais. Essa observação foi confirmada com a análise histológica uma vez que na mesma não foram identificadas, sob microscopia óptica, modificações nas estruturas desses órgãos.

Outros estudos realizados com *Bixa orellana* têm revelado que os pigmentos bixina e norbixina, presentes nas sementes dessa espécie vegetal, não exerce qualquer ação relacionada à genotoxicidade, toxicidade subaguda e crônica, toxicidade reprodutiva ou carcinogênese (PAUMGARTTEN *et.al.*, 2002; HAGIWARA *et.al.* 2003).

Como a suspensão das sementes de urucum mostrou-se isenta de efeitos tóxicos nos tempos (30 e 90 dias) e nas doses estudadas, avaliou-se o seu efeito sobre o metabolismo lipídico de camundongos com dislipidemia induzida farmacologicamente por triton WR-1339, etanol, poloxamer 407 e dieta hipercalórica.

Dislipidemia induzida por triton WR-1339 e poloxamer-407

O conceito de que as dislipidemias predis põem à aterosclerose, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral é universalmente aceito pela comunidade científica e, apesar das dislipidemias constituírem um risco independente da doença arterial coronariana (DAC), sua associação com outros fatores de risco aumenta a prevalência de eventos cardiovasculares (SILVA *et.al.*, 2004; FROHLICH & LEAR, 2002).

Estudos epidemiológicos têm estabelecido a importância de fatores dietéticos no desenvolvimento de doenças cardiovasculares em homens e animais, evidenciando uma relação direta entre o nível de lipídeos no sangue e o grau de aterogênese (SILVA, 2001).

Recentemente, uma atenção maior tem sido atribuída a pesquisas relacionadas à descoberta de novas drogas capazes de reduzir ou regular os níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos, resultando em inúmeros achados de atividades terapêuticas de agentes naturais (KIM *et.al.*, 2008). Como exemplo, pode-se citar o estudo da ação de uma proteína isolada das sementes de *Amaranthus cruentus* no metabolismo lipídico (ESCUADERO *et.al.*, 2006), avaliação da atividade hipolipidêmica das sementes de *Cássia tora* (PATIL *et.al.*, 2004), demonstração do potencial da *Mormodica charantia* como agente redutor dos níveis séricos de triglicerídeos (SENANAYAKE *et.al.*, 2004) e investigação do efeito do diterpeno isolado da *Croton cajucara Benth* na redução dos triglicerídeos (SILVA *et.al.*, 2001).

Tem sido evidenciado que certas substâncias químicas, tais como surfactantes/detergentes, possuem potencial para desencadear hiperlipidemia se consumidos excessivamente e/ou por tempo prolongado (WASAN *et.al.*, 2003). Porém é importante salientar que o desenvolvimento da dislipidemia vai depender da concentração do surfactante utilizada uma vez que alguns deles são empregados como matérias-primas em preparações farmacêuticas e cosméticas (COGGER *et.al.*, 2006).

Desenvolvidos em 1950, os polímeros triton WR-1339 (tiloxapol) e Poloxamer-407 tem sido empregados em modelos experimentais pré-clínicos de indução de hiperlipidemia (JOHNSTON, 2004; SCHOTZ *et.al.*, 1957). Tais protocolos têm sido aplicados como uma forma de *screening* na descoberta de novos agentes hipolipidêmicos (TAKAHASHI *et.al.*, 2003).

De acordo com Millar *et.al.*, (2005), o poloxamer-407 é mais hidrofílico do que o triton, uma vez que possui um elevado número de balanço hidrofílico/lipofílico, sendo de 22,0 para o primeiro e 12,9 para o segundo. Dessa forma, pode-se inferir que quanto maior esse número, mais polar é o surfactante. É importante destacar que ambos os polímeros são solúveis em água e o conhecimento das características de polaridade é peculiar na preparação das soluções com esses tensoativos.

O triton WR-1339 é um detergente não iônico que tem sido utilizado para estudar a secreção lipídica hepática bem como determinar ação de várias drogas nessa via metabólica. Uma grande variedade de espécies animais, tais como cachorros, macacos, cobaias, coelhos, ratos e camundongos já foram descritos como responsivos, sofrendo alterações nos seus níveis plasmáticos de lipídios após a administração de tal surfactante (HALL *et. al.*, 2000).

A administração de triton proporciona um quadro de dislipidemia, caracterizada pelo aumento dos níveis séricos de triglicerídeos que parece ser acarretada pelo bloqueio da remoção desses do plasma. Para a hipercolesterolemia, sugere-se que os mecanismos envolvidos incluem estimulação da síntese hepática de colesterol (aumento de HMG-CoA redutase), e efluxo desse dos tecidos para a circulação (FRIEDMAN & BAYER, 1957).

Acredita-se, ainda, que o triton forme uma camada na superfície das lipoproteínas, evitando que elas sofram a ação enzimática, especialmente no caso do VLDL, onde parece haver uma proteção da hidrólise provocada pela lipoproteína lípase (LPL), levando a uma hipertrigliceridemia (HALL *et.al.*; 2000; PATIL *et.al.*, 2004).

A VLDL tem por função o transporte dos TG sintetizados pelo fígado para os tecidos periféricos. Os triglicerídeos existentes nessa lipoproteína sofrem um processo de hidrólise mediado pela lipoproteína lípase localizada na superfície das células endoteliais vasculares tais como tecido adiposo, células musculares e cardíacas. Outra molécula importante nesse processo é a apolipoproteína C-II, que funciona como um potente ativador da LPL. Essa apoproteína é transferida do HDL para a VLDL e, resultados de estudos prévios tem sugerido que o triton evita essa transferência entre essas lipoproteínas (HALL *et.al.*, 2000).

Dessa forma, o aumento relevante da concentração plasmática de colesterol e triglicerídeos verificados pela injeção de triton WR-1339 resulta principalmente da exacerbação da secreção de VLDL pelo fígado, ausência de transferência de apo C-II que ocasiona uma redução significativa do catabolismo de LDL e VLDL (HARNAFI *et.al.*, 2007).

A dose utilizada de tiloxapol 400mg/kg, no presente estudo, está de acordo com os estudos realizados por Takahashi *et.al.* (2003) e Oh & Lim (2006). Nesse modelo experimental, a suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* nas doses de 200mg/kg, 400mg/kg e 800mg/kg promoveram redução significativa dos níveis de triglicerídeos. Esses resultados sugerem que a suspensão possivelmente foi capaz de viabilizar a transferência da apo C-II do HDL para a VLDL, fato este que estimula a atividade lipolítica da LPL e, conseqüentemente a hidrólise dos TG plasmáticos. Entretanto, mais estudos são necessários para identificar o exato mecanismo de ação de como a SABO foi capaz de restaurar o desequilíbrio no metabolismo dos TG induzido após injeção i.p. de triton.

De acordo com os estudos desenvolvidos por Millar *et.al* (2005), o uso de poloxamer-407 é uma alternativa preferível ao emprego do triton WR1339, para a determinação da produção hepática de triglicerídeos, sendo mais vantajoso principalmente em experimentos que demandam um maior período de tempo. Além disso, tem sido reportado que poloxamer-407 é um modelo experimental bastante utilizado por ser mais conveniente, ter boa reprodutibilidade e não promover outras condições patológicas indesejáveis (KIM *et.al.*, 2008).

Dessa forma, também foi avaliado o efeito da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* sobre a dislipidemia induzida por poloxamer 407, uma vez que esse surfactante parece produzir uma hiperlipidemia mais elevada e duradoura (MILLAR *et.al.*, 2005).

O poloxamer-407 (P-407) ou Pluronic[®]-127, igualmente ao triton WR-1339, é um surfactante não iônico e hidrofílico largamente empregado em protocolos experimentais de hiperlipidemia, uma vez que ocasiona elevações significantes do colesterol e triglicerídeos plasmáticos em modelos animais incluindo ratos, camundongos e coelhos (WASAN *et. al.*, 2003). Tal efeito sobre os parâmetros do metabolismo lipídico tem sido explicado pela inibição significativa da lipoproteína lípase (LPL) plasmática, tanto *in vitro* como *in vivo*, acompanhada pelo aumento da atividade da LPL tecidual (JOHNSTON & PALMER, 1993). Tem sido reportado ainda que o P-407 não possui ação sobre a HMG-CoA redutase, atuando somente na inibição da 7- α hidroxilase (JOHNSTON, 2004), sendo portanto possivelmente esse o seu mecanismo de indução da hipercolesterolemia.

A dose utilizada de poloxamer 407, que foi de 1000mg/kg, está de acordo com os estudos realizados por Wasan *et.al.* (2003), Cogger *et.al.* (2006) e Millar *et.al.* (2005). O tratamento dos camundongos com SABO, nas doses 200mg/kg, 400mg/kg ou 800mg/kg, promoveu uma diminuição significativa dos valores de triglicerídeos comparando-se com o grupo controle. Sendo que, a redução mais relevante foi com a administração da SABO 400mg/kg, após 72h de experimento.

Entretanto, somente o gemfibrozil foi capaz de reverter, mesmo que parcialmente, o quadro de hipercolesterolemia. Devido a ausência de efeito da SABO nesse parâmetro bioquímico no protocolo estudado, pode-se sugerir também que a mesma não atue sobre a atividade da enzima 7- α hidroxilase, já que se atribui a elevação do colesterol a esse componente.

Esses resultados sugerem que a suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* pode ser um agente efetivo na redução lipídica e um potencial protetor do desenvolvimento de doenças cardiovasculares resultantes do quadro de hiperlipidemia farmacológica. Mesmo não se podendo afirmar com exatidão o

mecanismo de ação para a atividade de tal suspensão, os resultados dos protocolos experimentais aqui realizados são sugestivos de que a mesma atue estimulando a LPL plasmática bem como diminuindo a atividade da LPL tecidual.

No protocolo experimental realizado com poloxamer 407 verificou-se, ainda, que as reduções nos níveis de triglicerídeos promovidas pela administração da SABO 400mg/kg, em todos os períodos estudados, foi maior que a proporcionada pelo fármaco de referência, no caso, o gemfibrozil.

Diante do exposto, os resultados aqui demonstrados são bastante promissores uma vez que a SABO foi capaz de diminuir os valores dos parâmetros lipídicos avaliados em proporções maiores que aquelas verificadas com o medicamento de referência encontrado no mercado farmacêutico.

Mediante os efeitos hipolipidêmicos revelados com a administração da suspensão aquosa de *Bixa orellana*, realizou-se partições com solventes de caráter polar e apolar (n-butanol, acetato, clorofórmio, hexano) na tentativa de rastrear qual a fração responsável por tais efeitos.

Os estudos comparativos do extrato metanólico de *Sophora flavescens* e suas partições clorofórmica, acetato, n-butanólica e aquosa, realizados por Kim *et. al.* (2008), demonstraram que as frações estudadas, dependendo do caráter de polaridade promoveram reduções maiores ou menores que as encontradas com o extrato metanólico bruto. Esses resultados corroboram, em alguns aspectos, com os do presente estudo, uma vez que todas as partições oriundas da SABO demonstraram, no período de 72h, reduções significativas dos valores de triglicerídeos, entretanto a diminuição mais relevante foi com a fração clorofórmica. Dentre as demais frações testadas, é importante destacar que somente a clorofórmica revelou potencial hipocolesterolêmico, demonstrando um efeito que não foi encontrado com a SABO nos protocolos agudos de dislipidemia.

Mesmo a fração clorofórmica revelando atividade sobre o metabolismo dos triglicerídeos, verificou-se que o percentual de redução maior foi encontrado com a suspensão aquosa das sementes de urucum, indicando que possivelmente ocorra

um sinergismo das substâncias contidas nessa suspensão. Entretanto, a identificação da partição mais efetiva, a clorofórmica, poderá embasar estudos químicos posteriores para a descoberta e isolamento de uma substância ou conjunto de moléculas, as quais se atribuam as atividades aqui descritas.

Mediante as informações obtidas com os protocolos experimentais de dislipidemia induzida por triton WR-1339 e poloxamer 407, procedeu-se com o modelo experimental de hipertrigliceridemia promovida pela administração de etanol. Esse protocolo possui um mecanismo de indução de dislipidemia diferente dos demais até então descritos, sendo eleito na tentativa de sugerir um mecanismo de ação da SABO sobre os níveis de TG, pois o mesmo só altera do lipídeo em questão.

Dislipidemia induzida por etanol

O álcool é uma substância presente em bebidas como cerveja, vinho e aguardente sendo, então, amplamente consumido e comercializado (AGUIAR & SOUZA, 2000). Tem sido descrito na literatura que a ingestão de álcool pode trazer benefícios ou não, sendo a quantidade e o período de consumo fatores determinantes para o desenvolvimento de efeitos tão distintos (GINTER & SIMKO, 2008).

De acordo com Ginter & Simko (2008), a ingestão moderada de etanol tem uma correlação direta com o aumento dos níveis séricos de colesterol-HDL, apesar desse mecanismo não ter sido completamente elucidado. Estudos têm sido realizados na tentativa de descobrir qual o provável mecanismo de elevação dessa lipoproteína e constatou-se que provavelmente não há o envolvimento das enzimas chaves no metabolismo do colesterol tais como lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) e proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) (RIEMENS *et al.*, 1997).

Entretanto, a exposição à altas doses desse composto causa destruição parcial do fígado e sistema nervoso, depressão respiratória, problemas de disfunção

sexual (impotência e/ou ejaculação precoce), doenças cardiovasculares e até a morte (AGUIAR & SOUZA, 2000).

No que diz respeito ao metabolismo do etanol, após a sua ingestão, ele é completamente absorvido no intestino delgado por difusão passiva. Quando ingerido em jejum, o processo absorptivo é mais rápido, alcançando picos plasmáticos entre 30 e 90 minutos. Sua distribuição no organismo é mediada pela quantidade de água contida nos órgãos e tecidos, uma vez que o etanol é uma partícula pequena e hidrofílica. A eliminação acontece após o metabolismo que ocorre, principalmente, via oxidação hepática (RAMCHANDANI *et.al.*, 2001).

Todo o etanol absorvido deve ser oxidado, uma vez que este não pode ser armazenado (CABALLERIA, 2003). No hepatócito, há três vias principais de biotransformação (oxidação) do etanol a acetaldeído, que é seu metabólito tóxico. Dependendo do compartimento celular onde vai ser processado, tem-se as seguintes rotas metabólicas: álcool desidrogenase (citosol), sistema microsomal de oxidação (retículo endoplasmático) e catalase (peroxissomos) (RAMCHANDANI *et.al.*, 2001). A segunda etapa ocorre na mitocôndria e consiste em converter acetaldeído em acetato pela acetaldeído desidrogenase. O acetato produzido vai então funcionar como fonte de CO₂, água e ácidos graxos para os tecidos periféricos (CABALLERIA, 2003).

A principal via de oxidação do álcool é pela ação da enzima álcool desidrogenase (LIEBER, 2000). Nesse processo o hidrogênio é transferido para o cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), convertendo-o em sua forma reduzida (NADH). O excesso da produção de NADH acarreta modificações no sistema redox, sendo responsável por várias alterações metabólicas (YU & CRONHOLM, 1997). O aumento da relação NADH/NAD eleva a concentração de α -glicerofosfato que favorece a deposição de triglicerídeos no fígado. Dentre os mecanismos pelos quais há o desenvolvimento do quadro de hipertrigliceridemia pela ingestão de etanol, tem-se o aumento da síntese hepática de ácidos graxos e diminuição de sua oxidação bem como aumento da mobilização dos ácidos graxos do tecido adiposo (CABALLERIA, 2003). Dessa maneira, é que tenta se explicar uma produção maior de triglicerídeos, além de se criar condições favoráveis ao

aparecimento da esteatose hepática (KITSON & WEINER, 1996; JÚNIOR *et.al.*, 1998; SZKUDELSKI & KANDULSKA, 1999; YOU & CRABB, 2004).

Como conseqüência da metabolização do etanol, verifica-se ainda a produção de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) que são importantes fatores no que diz respeito à patogênese da injúria hepática bem como o desenvolvimento da doença aterosclerótica (JÚNIOR *et.al.*, 1998; SANTOS *et.al.*, 2001).

Nesse protocolo experimental, antes da oferta de etanol a 10% nos bebedouros, realizou-se um jejum hídrico (RAMCHANDANI *et.al.*, 2001) de 6h tornando os animais mais ávidos por essa solução hidroalcolica.

A administração da suspensão aquosa das sementes nas duas maiores doses proporcionou uma redução relevante nos níveis séricos de triglicerídeos, que foi dose dependente. Sugere-se que a SABO possa ter restabelecido o desequilíbrio no sistema redox causado pela ingestão de etanol, diminuindo a síntese das VLDL pelo fígado e, conseqüentemente, os níveis séricos de triglicerídeos. Além disso, a manutenção dos níveis séricos de colesterol total próximo aos do grupo controle pode ser explicada pela ausência de ação do etanol sobre as enzimas LCAT e CEPT.

Seria de grande relevância a determinação de colesterol HDL nesse protocolo, uma vez que o etanol eleva seus níveis. Entretanto, as técnicas laboratoriais disponíveis nos kits comerciais não são eficazes na quantificação desse parâmetro nos animais em estudo devido à elevada hipertrigliceridemia induzida pelos protocolos experimentais.

Dessa forma, a SABO nas doses estudadas parece realmente ter um potencial hipolipidêmico sobre os níveis de TG em modelos experimentais pré-clínicos agudos de dislipidemias induzidas, sendo esse efeito atribuído provavelmente à sua ação sobre o metabolismo da VLDL, que é uma lipoproteína com elevado conteúdo de triglicerídeos.

De acordo com os achados nos delineamentos experimentais descritos até o momento, foi idealizada a execução de um protocolo de hipercolesterolemia crônico

no intuito de verificar a atividade da SABO sobre esse parâmetro. Para tanto, foram utilizadas as mesmas doses de SABO anteriormente estudadas, bem como a partição clorofórmica nas doses de 2,3mg/kg, 4,6mg/kg e 9,2mg/kg, sendo essa escolhida pela constatação de seu efeito hipocolesterolêmico no protocolo do poloxamer-407.

Hipercolesterolemia induzida por dieta modificada

Dentre as várias funções desempenhadas pelo fígado a mais importante, do ponto de vista do trato digestivo, é a secreção da bile. Essa última possui na sua composição fosfolípidos, colesterol, pigmentos e ácidos biliares (65%) (BURTIS *et.al.*, 2008). O colesterol é sintetizado continuamente em todo o organismo, mas deve ser eliminado uma vez que seu acúmulo aumenta a predisposição à aterosclerose. Assim, uma parte do colesterol é convertida no fígado a ácidos biliares, sendo esses divididos em primários e secundários. Os primários são assim denominados pela sua origem hepática e conhecidos como ácido cólico e desoxicólico, enquanto que os secundários são formados a partir da ação de enzimas da flora bacteriana sobre os primários. A principal função atribuída aos ácidos biliares é a emulsificação dos lipídeos oriundos da dieta atuando principalmente na formação das micelas e proporcionando uma absorção mais efetiva (KANAAAN *et.al.*, 2008).

Alguns estudos têm sugerido também que o ácido cólico, além de potencializar o efeito do colesterol dietético, aumentando a sua absorção, pode, por outro lado, inibir a conversão de colesterol a ácidos biliares, favorecendo o acúmulo de lipídios no fígado e promovendo o chamado "fígado gorduroso" nos animais (MACHADO *et.al.*, 2003; BEHER *et.al.*, 1962).

Os lipídeos oriundos da dieta têm despertado interesse científico uma vez que podem ser potenciais modificadores dos fatores de risco para doenças cardiovasculares. Alguns autores descrevem que os ácidos graxos de cadeia média são rapidamente absorvidos no intestino na ausência da lípase pancreática, sendo transportados para o fígado onde são rapidamente oxidados. Além disso, eles

parecem não depositar-se no tecido adiposo apresentando, portanto, uma correlação inversa com a obesidade. Em contrapartida, os ácidos graxos de cadeia longa saturados estimulam a biossíntese de colesterol ou são metabolizados e convertidos em triglicerídeos (DAYRIT, 2003)

O óleo de coco (*Cocos nucifera*) possui na sua composição aproximadamente 92% de ácidos graxos saturados, dentre os quais os triglicerídeos de cadeia média contribuem com 70% do total do seu percentual de ácidos graxos. O restante da composição é conferido a 6% de ácidos graxos monoinsaturados e 2% aos poliinsaturados (CHANDRASHEKAR *et.al.*, 2010). Como o óleo de coco possui uma grande quantidade de ácidos graxos de cadeia média, eles parecem ter ações benéficas no metabolismo dos lipídeos, embora essa ação ainda não esteja bem documentada na literatura (THOLSTRUP *et.al.*, 2004).

Diante do que foi exposto, pode-se observar claramente que o acréscimo de ácido cólico na ração utilizada no presente estudo foi realizado no intuito de facilitar a absorção dos lipídeos nela contida.

Dentre os resultados obtidos nesse protocolo experimental, tem-se a curiosa redução dos níveis de triglicerídeos de todos os grupos que foram alimentados com a referida ração. Não se sabe qual o mecanismo real envolvido nessa diminuição, devendo estar provavelmente associada com algum dos componentes utilizados na produção da ração modificada. Pode-se sugerir que o óleo de coco, provavelmente, seja o responsável pelo efeito mencionado, pois se trata de um ácido graxo de cadeia média que poderia estar promovendo uma ação protetora sobre os lipídeos, ação esta similar ao efeito benéfico atribuído ao azeite de oliva. Entretanto, é necessária a realização de estudos mais detalhados e específicos a esse respeito.

A SABO, em todas as doses testadas, bem como CLO 3 foram capazes de promover uma redução nos níveis séricos de colesterol equivalente à obtida com a administração de sinvastatina. A suspensão em estudo pode ter interferido nas enzimas participantes do metabolismo do colesterol em nível hepático, dentre elas a HMG-CoA redutase, a principal envolvida na regulação da síntese desse lipídeo. É importante destacar que a CLO 3 demonstrou ser mais efetiva na redução do CT

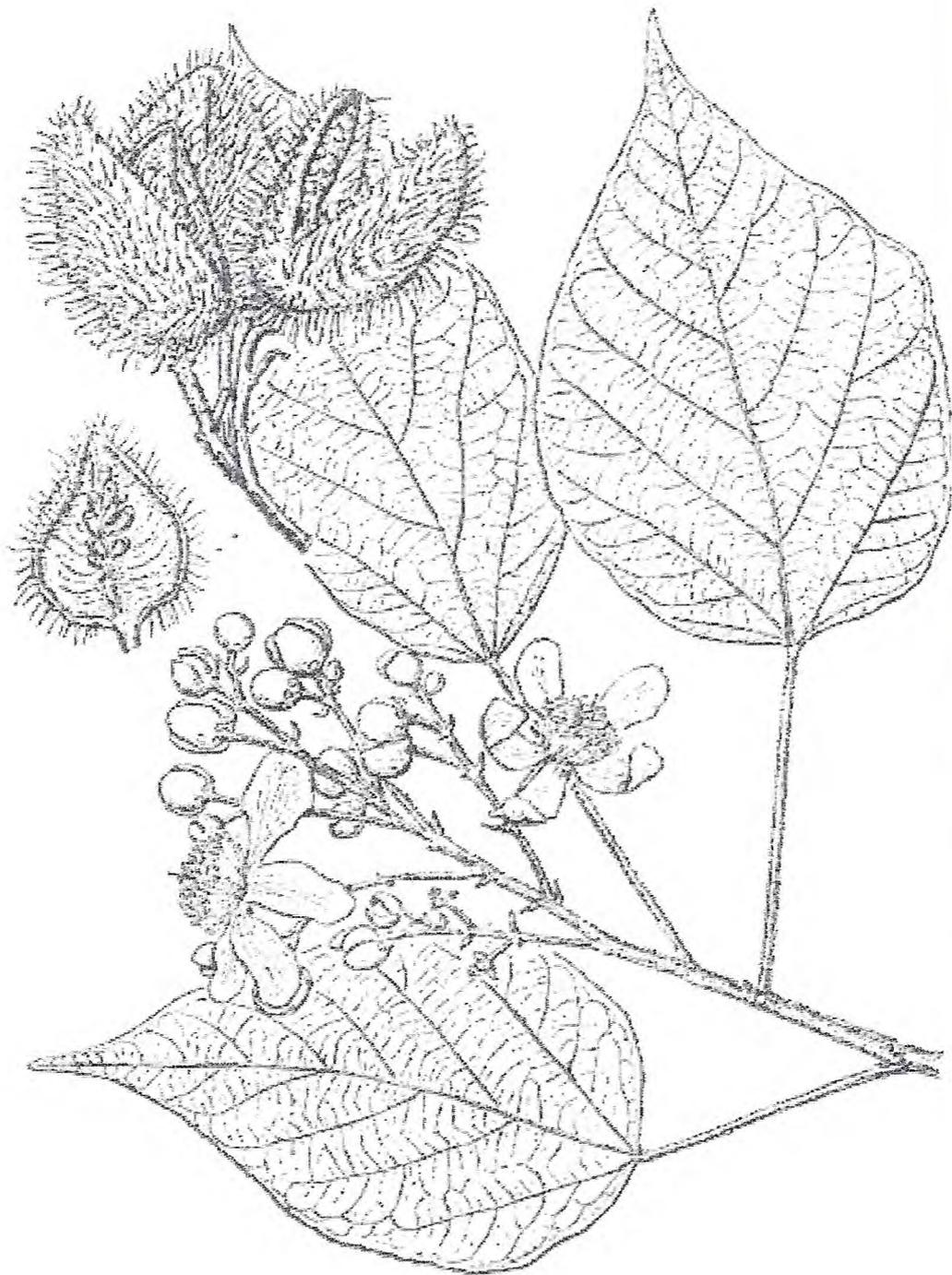
que o fármaco referência utilizado no protocolo experimental. Entretanto, todas as doses de partição clorofórmica testadas, aumentaram os níveis de AST significativamente, podendo esse fato ter sido observado pela presença de resíduos de solvente, ou seja, clorofórmio.

Pode-se sugerir também, que o colesterol por ter uma produção endógena significativa pode demandar um maior tempo de tratamento com agentes hipolipidêmicos para que sua redução seja alcançada. Assim, tenta-se justificar a razão da SABO não ter demonstrado potencial hipocolesterolêmico nos protocolos agudos, inicialmente descritos, tais como poloxamer-407 e triton.

De acordo com os protocolos realizados, a SABO parece interferir na produção de VLDL (protocolo do etanol), bem como na excreção hepática dessa lipoproteína (protocolos do triton e P-407), provavelmente interagindo com enzimas participantes no metabolismo de TG no fígado (interferência em enzimas hepáticas – protocolo de toxicidade de doses repetidas) e/ou em outros tecidos (LPL/CEPT).

A identificação de redução dos níveis séricos de CT pela SABO somente no protocolo experimental da ração modificada sugere que esse lipídeo por ter uma produção endógena significativa necessite de um maior tempo de tratamento para que sua redução seja alcançada.

Verificou-se ainda que a SABO foi bem mais efetiva que suas frações isoladamente, indicando que provavelmente tenha ocorrido um sinergismo das substâncias contidas nessa suspensão. A SABO, de acordo com os achados desse estudo, parece ser mais segura do que a partição clorofórmica uma vez que esta se apresentou potencialmente tóxica pelo aumento de AST.



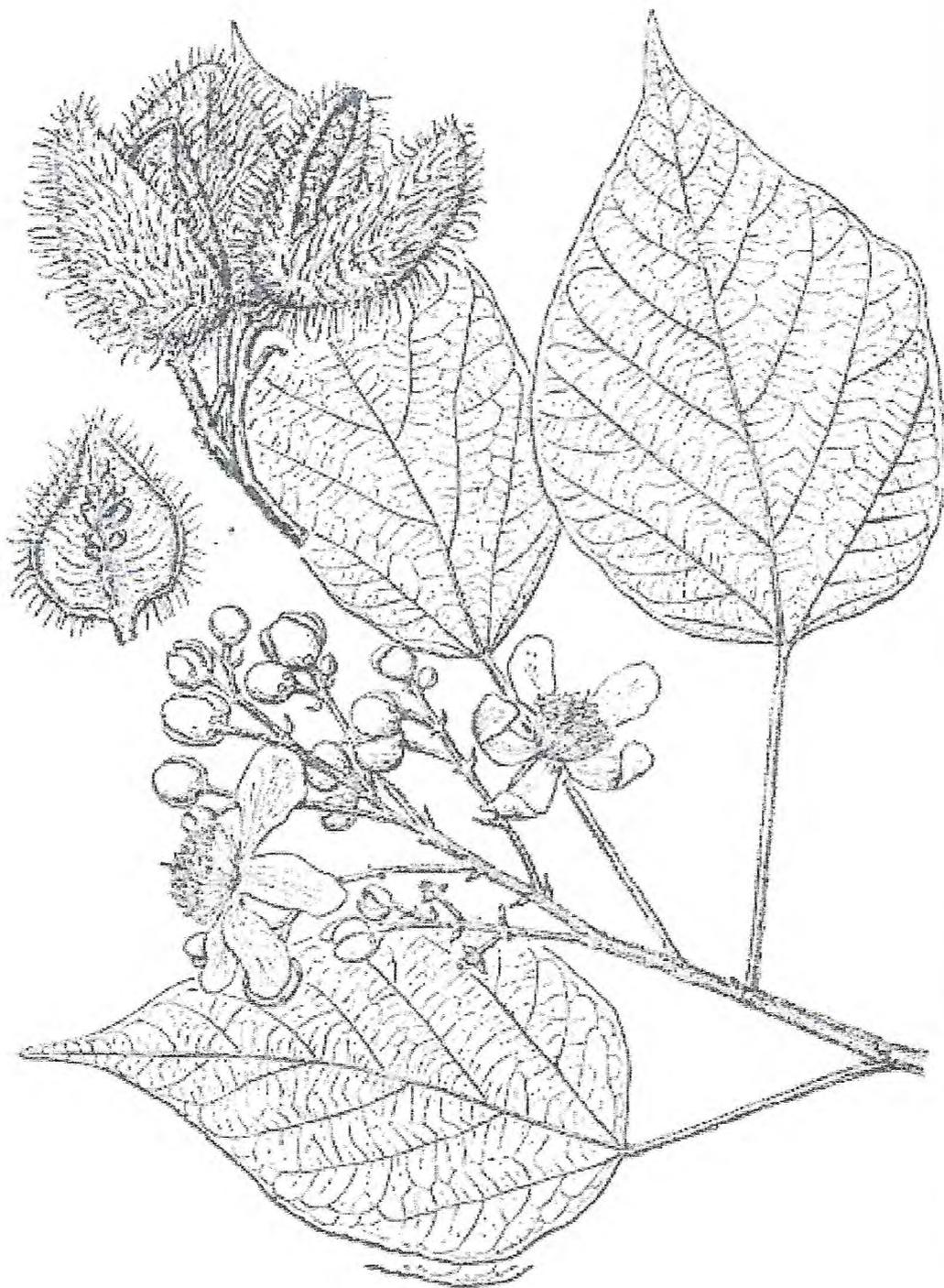
**C
O
N
C
L
U
S
Ã
O**

6 CONCLUSÃO

A SABO não promoveu alterações significativas nos parâmetros bioquímicos, hematológicos e nas análises histológicas, sugerindo ausência de toxicidade, exceto em relação à glicemia. Além disso, de acordo com os protocolos experimentais de dislipidemia realizados, verificou-se que essa suspensão parece ter uma potencialidade terapêutica hipolipidêmica, na redução tanto de triglicerídeos como de colesterol total. As substâncias presentes na SABO provavelmente possuem características químicas compatíveis com a partição clorofórmica visto que ela foi a mais efetiva dentre as demais, o que sugere a existência de um complexo fitoterápico.

De acordo com o mecanismo de ação das drogas indutoras de dislipidemias, pode-se sugerir que a SABO atue nas enzimas envolvidas com o metabolismo do colesterol e triglicerídeos (VLDL), 7- α -hidroxilase, HMG CoA redutase e lipoproteína lípase.

Os resultados são bastante promissores verificando-se a necessidade de mais estudos para desvendar os reais mecanismos de ação hipolipidêmicos da SABO, através de ferramentas de biologia molecular, além de avaliar a viabilidade de sua futura aplicação na terapêutica.



R
E
F
E
R
Ê
N
C
I
A
S
B
I
B
L
I
O
G
R
Á
F
I
C
A
S

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADENEYE, A.A.; AJAGBONNA, O.P.; ADELEKE, T.I.; BELLO, S.O. Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. **Journal of Ethnopharmacology** 105, 374–379, 2006.

AFOLAYAN, A.J.; YAKUBU, M.T.; APPIDI, J.R.; MOSTAFA, M. Toxicological implications of aqueous extract of *Clematis brachiata* Thunb. leaves in male *Wistar* rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 3(11), 531-538, 2009.

AGUIAR, J.I.A. & SOUZA, J.A. A ingestão de álcool etílico e enfermidades associadas. **Ministério da Saúde** (Anais do seminário sobre alcoolismo e vulnerabilidade às DST/AIDS entre os povos indígenas da macrorregião sul, sudeste e mato grosso do sul), artigo 3, 51-60, 2000.

AKANJI, M.A.; YAKUBU, M.T. Tocopherol protects against metabisulphite-induced tissue damage in rats. **Niger. J. Biochem. Mol. Biol.** 15(2): 179-183, 2000.

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

ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos y Nutracêuticos**. Rosário: Corpus, p. 41-45, 2004

ALVES, R.W. **Extração de corantes de urucum por processos adsortivos utilizando argilas comerciais e *colloidal gas aphyrons***. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, p.1, 2005.

ALVIM, N.A.T.; FERREIRA, M.A.; CABRAL, I.A.; ALMEIDA-FILHO, A.J.A. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da

prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Rev Latino Am. Enfermagem** 14 (30), 2006.

ANIAGU, S.O.; NWINYI, F.C.; AKUMKA, D.D.; AJOKU, G.A.; DZARMA, S.; IZEBE, K.S; *et.al.* Toxicity studies in rats fed nature cure bitters. **African Journal of Biotechnology** 4 (1), 72-78, 2005.

ASHAFA, A.O.T.; YAKUBU, M.T.; GRIERSON, D.S.; AFOLAYAN, A.J. Toxicological evaluation of the aqueous extract of *Felicia muricata Thunb.* leaves in wistar rats. **African Journal of Biotechnology**, vol. 8 (6), 949-954, 2009.

ASGARY, S.; PARKHIDEH, S.; SOLHPOUR, A.; MADANI, H.; MAHZOUNI, P.; RAHIMI, P. Effect of ethanolic extract of *Juglans regia L.* on blood sugar in diabetes-induced rats. **Journal of Medicinal Food** 11(3), 533-538, 2008.

ARNOUS, A.H.; SANTOS, A.S.; BEINNER, R.P.C. Plantas medicinais de uso caseiro – conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde** 6 (2), 1-6, 2005.

BAUTISTA, A.R.P.L; MOREIRA E.L.T; BATISTA, M.S; MIRANDA M.S; GOMES I.C.S. Subacute toxicity assessment of annatto in rat. **Food and Chemical Toxicology** 42, 625–629, 2004.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2000.

BABAYI, H.M.; UDEME, J.J.I.; ABALAKA, J.A.; OKOGUN, J.I.; SALAWU, O.A.; AKUMKA, D.D.; HND, A.; ZARMA, S.S.; ADZU, B.B.; ABDULMUMUNI, S.S.; ELISHA, K.I.B.B.E.; SAKARIYS, S.S.; INYANG, U.S. Effect os oral administration os aqueous whole extract of *Cassytha filiformis* on haemograms and plasma biochemical parameters in rats. **Journal of Medical Toxicology** 3 (4), 146-151, 2007.

BARRIO, A.G.; GRUEIRO, M.M.M.; MONTREO, D.; NOGAL, J.J.; ESCARIO, J.A.; MUELAS, S.; FERNANDEZ, C. VEJA, C.; ROLON, M.; FERNANDEZ, A.R.M. SOLIS, P.N.; GUPTA, M.P. *In vitro* antiparasitic activity of plant extracts from Panama. **Pharmaceutical Biology** 42, 332-337, 2004.

BEHER, W.T.; BAKER, G.D.; PENNEY, D.G. A comparative study of the effects of bile acids and cholesterol on cholesterol metabolism in the mouse, rat, hamster and guinea pig. **J. Nutr.**79 (63), 523-530, 1962.

BOTHAN, P.A. Acute systemic toxicity-prospects for tired testing strategies. **Toxicology in vitro**,18(2), 227-230, 2004

BRASIL (2004a) Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 48 de 16/03/04. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. Diário Oficial da União 18/03/04.

BRASIL (2004b) Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Especial nº 90 de 16/03/04. **Determina a publicação da “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica e clínica de fitoterápicos”**. Diário Oficial da União 18/03/04.

BRASIL (2006b). Atos do poder executivo. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. **Aprova a política nacional de plantas medicinais e dá outras providências**. Brasília, Ministério da Saúde.

BRASIL (2006c). Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos – **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, Ministério da Saúde.

BRASIL (2009). Ministério da Saúde. RENISUS. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2009.

BRASIL (2010). Ministério da Saúde. Diário Oficial da União 22/04/2010. Portaria nº 886 de 20 de abril de 2010. **Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema único de Saúde**. Brasília, Ministério da Saúde

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. **Tietz: Fundamentos de Química Clínica**. Rio de Janeiro. 6ª edição. Editora: Elsevier, 413-440, 2008.

CABALLERIA, J. Current concepts in alcohol metabolism. **Annals of Hepatology** 2(2), 60-68, 2003.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). **Braz. J. Med. Biol. Res** 33(2), 179-189, 2000.

CAMBRI, L.T.; SOUZA, M.; MANNRICH, G.; CRUZ, R.O.; GEVAERD, M.S. Perfil lipídico, dislipidemias e exercício físico. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano** 8 (3), 100-106, 2006.

CAMPESATO, V.R. **Uso de plantas medicinais durante a gravidez e risco para malformações congênitas**. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; MAHMUD, N.S.; SHUQAIR, S.A.Q.; NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T & C Amazônia**, ano V, nº 11, 2007.

CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **R. Árvore – Viçosa (MG)** 29 (6), 887-895, 2005.

CASTILLO, M.; HORTAL, J.H; AGUILERA, J.A; ZAFRA, M.F & CARCIA – PEREGRINE, E. Different hypercholesterolemic effects of cholesterol and saturated fat on neonatal and adult chickens. **Comp Biochem Physiol** 107A, 209 – 213, 1994.

CAZARIN, K.C.C.; CORREA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** 40 (3), 289-299, 2004

CHANDRASHEKAR, P.; LOKESH, B.R.; KRISHNA, A.G.G. Hypolipidemic effect of blends of coconut oil with soybean oil or sunflower oil in experimental rats. **Food Chemistry**. Article in press. 2010.

COGGER, V.C.; HILMER, S.H.; SULLIVAN, D.; MULLER, M.; FRASER, R.; COUTEUR, D.G.L. Hyperlipidemia and surfactants: the liver sieve is a link. **Atherosclerosis** 189, 273-281, 2006.

CONSTANT, P.B.L.; STRINGHETA, P.C.; SANDI, D. Corantes Alimentícios. **B. CEPPA**. Curitiba. V.20 (2), p. 203-220, 2002.

COSTA, C.L.S. & CHAVES, M.H. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. **Química Nova**. 28 (1), 149-152, 2005.

DAYRIT, C.S. Coconut oil: atherogenic or not? (What therefore causes atherosclerosis?). **Philippine Journal of Cardiology** 31 (3), 97-104, 2003.

DIOKA, C.; ORISAKWE, O.E.; AFONNE, O.J.; AGBASI, P.U.; AKUMKA, D.D.; OKONKWO, C.J. and et.al. Investigation into the haematologic and hepatotoxic effects of rinbacin in rats. *Journal of Health Science*, 48 (5), 393 – 398, 2002.

DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um guia interdisciplinar**. São Paulo: Editora UNESP, 1996.

ELISABETSKY, E. 2007. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª edição. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2007.

ESCUADERO, N.L.; ZIRULNIK, F.; GOMEZ, N.N.; MUCCIARELLI, S.I.; GIMENEZ, M.S. Influence of a protein concentrate from *Amaranthus cruentus* seeds on lipid metabolism. **Experimental Biology and Medicine** 231, 50-59, 2006.

FAO/JECFA. Compendium of food additive specifications. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 67th meeting. Rome, 2006.

FELICISSIMO, M.P.; BITTENCOURT, C.; HOUSSIAU, L.; PIREAUX, JEAN-JACQUES. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry and x-ray photoelectron spectroscopy analyses of *Bixa orellana* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 52, 1810-1814, 2004.

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

FERREIRA, J.M.; SOUSA, D.F.; ALVES, C.D.; MARTINS, A.R.; MORAIS, T.M.F.; DANTAS, M.B.; MENEZES, D.B.; MARTINS, A.M.C.; QUEIROZ, M.G.R. **Comparative study of effects aqueous and ethanolic extracts of *Bixa orellana* seeds on lipoproteic metabolism of dyslipidemic mice.** CIFARP. Ribeirão Preto. In: Livro de Resumos, 2007a.

FERREIRA, J.M.; SOUSA, D.F.; DANTAS, M.B.; MARTINS, A.R.; MARTINS, G.A.A.; ALVES, C.D.; TOMAZ, C.C.; FONSECA, S.G.C.; BARREIRA, S.R.T.; MARTINS, A.M.C. QUEIROZ, M.G.R. **Atividade hipolipemiante do extrato aquoso de *Bixa orellana* em camundongos dislipidêmicos.** XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Águas de Lindóia-SP. In: Livro de resumos, 2007b.

FERREIRA, J.M.; SOUSA, D.F.; MARTINS, G.A.A.; TOMAZ, C.C.; MARTINS, A.R.; MORAIS, T.M.F.; DANTAS, M.B.; ARRUDA FILHO, A.C.V.; FONSECA, S.G.C.;

SOUZA, J.A.L.; QUEIROZ.M.G.R. **Renal and hepatic functions study of animals treated with aqueous extract of *Bixa orellana* seeds.** XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. São Paulo- SP. In: Livro de resumos, 2008.

FERREIRA, J.M. ; TOMAZ, C.C.; SOUSA, D.F.; ALVES, C.D.; MARTINS, A.R.M.; MORAIS, T.M.F.; DANTAS, M.B.; FONSECA, S.G.C.; MENEZES, D.B.; MARTINS, A.M.C.; QUEIROZ, M.G.R. **Comparative study of the effects of aqueous and ethanolic extracts of *Bixa orellana* seeds on lipoproteic metabolism of mice with ethanol induced hypertriglyceridaemia.** CIFARP. Ribeirão Preto. In: Livro de Resumos, 2007c.

FERREIRA, S.H.; BARATA, L.E.S.; SALES, S.L.M.; QUEIROZ, S.R.R. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil.** Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FILGUEIRAS, T.S.; PEIXOTO, T.S. Flora e vegetação do Brasil na carta de Caminha. **Acta. Bot. Bras.** 16 (3), 263-272, 2002.

FILHO, V.C. & YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova** 21 (1), 99-105, 1998.

FIGUEREDO, C. A. **Fitoterapia.** João Pessoa: NEPHF, 2007.

FLAMMANG,A.M.; EREXSON, G.L.; MIRWALD, J.M.; HENWOOD, S.M. Toxicological and cytogenetic assessment of a *Salacia oblonga* extract in a rat subchronic study. **Food and Chemical Toxicology** 45, 1954-1962, 2007.

FLEISCHER, T.C.; AMEADE, E.P.K.; MENSAH, M.L.K.; SAWER, I.K. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia** 74, 136-138, 2003.

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas medicinais como fontes de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, 2006.

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

FRANCO, C.F.O. *et.al.* **Corantes Naturais**. In: Simpósio Brasileiro do Urucum. Urucuzeiro Agronegócios de Corantes Naturais. 1ª edição. João Pessoa – PB, Edição Emepa, 71-78, 2002.

FREITAS, E.V. Triglicerídeos e doença arterial coronariana. **Revista da SOCERJ** 17(1), 45-49, 2004.

FRIEDMAN, M. & BAYER, S. O. The mechanism underlying hypocholesterolemia induced by triton WR-1339. **American Journal of Physiology** 190, 439-445, 1957.

FROHLICH, J.; LEAR, S.A. Old and new risk factors for atherosclerosis and development of treatment recommendations. **Cin Exp. Pharmacol. Physiol** 29, 838-842, 2002.

GATTI, R.M.; SANTOS, B.R.M.; FURLANETO, C.J.; GOULART, I.M.M.; MOREIRA, P.A. Avaliação dos fatores de risco para doença arterial coronariana em pacientes de São Caetano do Sul segundo o Escore de Framingham e sua relação com a síndrome metabólica. **Arq Sanny Pesq Saúde**. 1(1):8-17, 2008

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

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; BERG, C.V.D. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade** 1(1), 52-61, 2005.

GINTER, E. & SIMKO, V. Ethanol and cardiovascular diseases: epidemiological, biochemical and clinical aspects. **Bratisl. Lek. Listy.** 109 (12), 590 – 594, 2008.

GOMES, A.P.F. & CARMO, M.G.T. Dislipidemia pós-prandial e doença cardiovascular. **Res. Bras. Nutr. Clin.**, 21 (1), 60-71, 2006.

HAGIWARA, A.; IMAI, N.; ICHIHARA, T.; SANO, M.; TAMANO, S.; AOKI, H.; YASUHARA, K.; KODA, T.; NAKAMURA, M.; SHIRAI, T. A thirteen-week oral toxicity study of annatto extract (norbixin), a natural food color extracted from the seed coat of annatto (*Bixa orellana* L.), in Sprague-dawley rats. **Food and Chemical Toxicology** 41, 1157-1164, 2003.

HALL, J.A.; GRADIN, J.L.; ANDREASEN, C.B.; WANDER, R.C. Use of a nonionic detergent (Triton WR1339) in healthy cats to assess hepatic secretion of triglyceride. **American Journal of Veterinary Research** 61(8), 941-950, 2000.

HALLAGAN, J.B.; ALLEN, D.C.; BORZELLECA, J.F.; The safety and regulatory status of food, drug and cosmetic colour additives exempt from certification. **Food and Chemical Toxicology** 33, 515-528, 1995.

HARNAFI, H.; BOUANANI, N.H.; AZIZ, M.; CAID, H.S.; GHALIM, N.; AMRANI, S. The hypolipidemic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers extract in triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: a comparison with fenofibrate. **Journal of Ethnopharmacology** 109, 156-160, 2007.

HEGELE, R.A. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. **Nat Rev Genet.**, 10, 109 – 121, 2009.

HEINZMANN, B.M. & BARROS, F.M.C. Potential of Brazilian native plants for the development of phytomedicines having *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (*Verbenaceae*) as example. **Saúde, Santa Maria**, vol. 33 (1), 43-48, 2007.

JOHNSTON, T.P. The P-407 induced murine model of dose-controlled hyperlipidemia and atherosclerosis: a review of findings to date. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 43, 595-606, 2004.

JOHNSTON, T.P. & PALMER, W.K. Mechanism of poloxamer-407-induced hypertriglyceridemia in the rat. **Biochemical Pharmacology** 46. 1037-1042, 1993.

JORGE, P.A.R.; NEYRA, L.C.; OSAKI, R.M.; ALMEIDA, E.; BRAGAGNOLO, N. Efeito da berinjela sobre os lipídeos plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia experimental. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 70(2), 1-5, 1998.

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

JÚNIOR, C.V.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova** 19 (2), p. 326-337, 2006.

KANNAN, S.; GRACIA, M.A.T.; PERALTA, R.H.S.; RIBEIRO, M.L.S.; BENJO, A.M.; AFFONSO, F.S. **Bioquímica Clínica**. São Paulo. Editora Atheneu. 1ª edição. Universidade Federal Fluminense. 2008.

KIM, H.Y.; JEONG, D.M.; JUNG, H.J.; JUNG, Y.J.; YOKOZAWA, T. CHOI, J.S. Hypolipidemic effects of *Sophora flavescens* and constituents in poloxamer 407-induced hyperlipidemic and cholesterol-fed rats. **Biol. Pharm. Bull.** 31 (1), 73-78, 2008.

KITSON, K.E. & WEINER, H. Ethanol and acetaldehyde metabolism : past, present and future. **Alcohol Clin Exp. Res.** 20, 82A-92A, 1996.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; LIMA, T.C.M., 2007. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª edição. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2007.

LEONARDO, S.B. **Extração de pigmentos de urucum e estabilidade de seus extratos e de sementes**. Dissertação de Mestrado. São Caetano do Sul, 2007.

LIEBER, C.S. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. **Journal of Medicine** 67(1), 84-93, 2000.

LIMA, I.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; STRINGHETA, P.C.; TINOCO, A.L.A.; SILVA, J.F. Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 38, 196-200, 2001.

LIMA, L.B. **Avaliação toxicológica pré-clínica do extrato seco de *Schinus terebinthifolius* Raddi (*Anacardiaceae*)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, 2009.

LIMA, R.J.C.; MORENO, A.J.D.; CASTRO, S.F.L.; GONÇALVES, J.R.S.; OLIVERA, A.B.; SASAKI, J.M.; FREIRE, P.T.C. Taninos hidrolisáveis em *Bixa orellana* L.). **Química Nova** 29(3), 507-509, 2006.

MACHADO, D.F.; FERREIRA, C.L.L.F.; COSTA, N.M.B.; OLIVEIRA, T.T. Efeito de probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico e no peso do fígado de ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido fólico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 23 (2), 270-275, 2003.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; JÚNIOR, V.F.V. GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova** 25 (3), 429-438, 2002.

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

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 4^a. ed. rev. ampl. Fortaleza: UFC, 2002.

MATOS, J.J.A.; SOUSA, M.P.; MATOS, M.E.O.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. Editora: UFC, 2004.

MERCADANTE, A.Z; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Phytochemistry**. v. 46, p.1379 – 1383, 1997.

MERCADANTE, A.Z; STECK, A.; PFANDER, H. Three minor carotenóides from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Phytochemistry**. v. 52, p.135 – 139, 1999.

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and approaches. **Toxicol. Letters** 140-141, 21-30, 2003.

MILLAR, J.S.; CROMLEY, D.A.; McCoy, M.G.; RADER, D.J.; BILLHEIMER, J.T. Determining hepatic triglyceride production in mice: comparison of poloxamer 407 with triton WR-1339. **Journal of Lipids Research** 46, 2023-2028, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **O Papel da Medicina Natural e Práticas Complementares de Saúde na Consolidação dos Princípios e Diretrizes da Reforma Sanitária**. Ministério da Saúde: Brasília, 2003.

MITTERMEIER, R.A.; FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; BRANDON, K. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. **Megadiversidade** 1 (1), 14-21, 2005.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para Laboratório: Princípios e Interpretações**. 4ª ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial, EDUCS - Caxias do Sul, 2003.

MUKINDA, J.T.; SYCE, J.A. (2007). Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology** 112, 138-144.

NELSON, D.L. & COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 4th ed. 246, 2006.

NYARKO, A.K.; OKINE, L.K.N.; WEDZI, R.K.; ADDO, P.A.; OFOSUHE, M. Subchronic toxicity studies of the antidiabetic herbal preparation ADD-199 in rat: absence of organ toxicity and modulation of cytochrome P450. **Journal of ethnopharmacology** 97, 319-325, 2005.

ODEYEMI, O.O.; YAKUBU, M.T.; MASIKA, P.J.; AFOLAYAN, A.J. Toxicological evaluation of the essential oil from *Mentha longifolia* L. subsp. *capensis* leaves in rats. **Journal of Medical Food** 12(3), 669 – 674, 2009.

OH, P.S. & LIM, K.T. Glycoprotein (90kDa) isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* makino lowers plasma lipid level through scavenging of intracellular radicals in triton WR-1339-induced mice. **Biol. Pharm. Bull** 29 (7), 1391-1396, 2006.

OLIVEIRA-FILHO, E.C. **A toxicologia e sua importância para a saúde e meio ambiente**. 2003. Disponível em <http://www.cprh.pe.gov.br>. Acesso em 10 mar. 2007.

OLIVEIRA, J.S. **Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Tese, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – Santa Catarina, 2005.

OLIVEIRA, N.T.E.; FONSECA, J.B.; SOARES, R.T.R.N.; FERREIRA, K.S. Triglicérides sanguíneos e a composição química da carne de cordões alimentados com bixina e niacina suplementar. **Pesq. Agropec. Bras.** 41 (8), 1227-1233, 2006.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; DEUN, K.V.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 32, 56-57, 2000.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the testing of chemicals, OECD 425. **Acute oral toxicity up and down procedure**. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 2008.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the testing of chemicals, OECD 420. **Acute oral toxicity-fixed dose procedure**. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the testing of chemicals, OECD 423. **Acute oral toxicity-acute toxic class method**. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 2001.

OTERO, R.; NUNEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMENEZ, S.L.; OSORIO, R.G.; SALDARRIAGA, M.; DIAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia - Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, 73 (1-2), 233-241, 2000.

PANDA, N.C. **Kidney: In textbook of biochemistry and human biology**. 2ª edição. Prentice-Hall of India. Private Ltd, 276-292, 1989.

PATIL, U.K.; SARAF S.; DIXIT, V.K. Hypolipidemic activity of seeds of *Cassia tora* Linn. **Journal of Ethnopharmacology** 90, 249-252, 2004.

PAUMGARTTEN, F.J.R.; DE-CARVALHO, R.R.; ARAÚJO, I.B.; PINTO, F.M.; BORGES, O.O.; SOUZA, C.A.M.; KURIYAMA, S.N. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. **Food and Chemical Toxicology** 40, 1595-1601, 2002.

PRADO, M.A.; GODOY, H.T. Determinação de corantes artificiais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em pó para gelatina. **Química Nova**. v.27(1), p. 22-26, 2004.

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

QI, X.Y.; CHEN, W.J.; ZHANG, L.Q.; XIE, B.J; Mogrosides extracts from *Siraitia grosvenori* scavenges free radicals in vitro and lowers oxidative stress, serum glucose, and lipid levels in alloxan-induced diabetic mice. **Nutrition Research** 28, 278-284, 2008.

RAMCHANDANI, V.A.; BOSRON, W.F.; LI, T.K. Research advances in ethanol metabolism. **Pathol Biol.** 49, 676-682, 2001

RAUBER, C.; MELLO, F.B.; MELLO, J.R.B. Pre-clinic toxicological evaluation of a phytotherapeutic containing *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto®) in Wistar rats. **Acta Scientiae Veterinariae** 34(1), 15-21, 2006.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis.** 2ª edição, Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, 201-205, 2001.

RIEMENS, S.C.; VAN TOLA, A.; HOOGENBERG, K. *et.al.* Higher high density lipoprotein cholesterol associated with moderate alcohol consumption is not related to altered plasma lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer protein activity levels, **Clin. Chim. Acta** 258, 105-115, 1997.

RIVIERA-MADRID, R.; ESCOBEDO-GM, R.M.; BALAM-GALERA, E.; VERA-KU, M.; HARRIES, H. Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). **Scientia Horticulturae.** v.109, 165-172, 2006.

RHIOUANI, H.; EL-HILALY, J.; ISRAILI, Z.H.; LYOUSSI, B. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Heniaria glabra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology** 118, 378-386, 2008.

RODRIGUES, A.G.; SANTOS, M.G.; AMARAL, A.C.F. Políticas públicas em plantas medicinais e fitoterápicos, p. 9-26. In: Brasil. Ministério da Saúde. **A fitoterapia no**

SUS e programa de pesquisa de plantas medicinais da central de medicamentos. Brasília, 2006.

SANTOS, R. D. *et al.* Resumo das III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento Brasileiro de Cardiologia. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 77, suplemento III, 2001.

SCHIAVO, M.; LUNARDELLI, A.; OLIVEIRA, J.R. Influência da dieta na concentração sérica de triglicerídeos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** 39 (4), p. 283-288, 2003.

SCHOTZ, M.C.A.; SCANU, A.; PAGE, I.H.; Effect of Triton on lipoprotein lipase of rat plasma. **Am. J. Physiol.** 188, 399-402, 1957.

SENANAYAKE, G.V.K.; MARUYAMA, M.; SHIBUYA K.; SAKONO M.; FUKUDA, N.; MORISHITA, T.; YUKIZAKI, C.; KAWANO, M.; OHTA, H. The effects of bitter melon (*Mormodica charantia*) on serum and liver triglyceride levels in rats. **Journal of Ethnopharmacology** 91, 257-262, 2004.

SHILPI, J.A.; TAUFIQ-UR-RAHMAN, M.; UDDIN, S.J.; ALAM, M.S.; SADHU, S.K.; SEIDEL, V. Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana L.* leaves. **Journal of ethnopharmacology.** v.108, 264-271, 2006.

SILVA, F.C.P.; FRANCO, C.F.O. Etnobotânica e taxonomia do urucuzeiro. In: **Urucuzeiro uma alternativa de agronegócio.** João Pessoa: EMEPA- PB, 1ª edição, p. 64, 2000.

SILVA, G.E.C.; TAKAHASHI, M.H.; FILHO, W.E.; ALBINO, C.C.; TASIM, G.E.; SERRI, L.A.F.; ASSEF, A.H.; CORTEZ, D.A.G.; BAZOTTE, R.B. Ausência de efeito hipolipemiante da *Solanum melongena L.* (berinjela) em pacientes hiperlipidêmicos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 48, p. 368-373, 2004.

SILVA, J.P.A.; SAMPAIO, L.S.; OLIVEIRA, R.S.; REIS, L.A. Medicinal plants used by diabetes mellitus type 2 carriers for likely glycemetic control in the city of Jequié-Bahia. **Rev. Saúde Com.** 4(1), 10-18, 2008.

SILVA, M.S.; ANTONIOLLI, A.R.; BATISTA, J.S.; MOTA, C.N. Plantas medicinais usadas nos distúrbios gastrointestinais no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. **Acta. Bot. Bras.** 20 (4), 815-829, 2006.

SILVA, R.R.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J; PINTO, A.S.; ALBINO, L.F.T.; ALMEIDA, M.R.; LEÃO, M.A. Curcumina e norbixina: ação no metabolismo lipídico de aves domésticas. **Medicina, Ribeirão Preto** 34, 177-182, 2001.

SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N.; MACIEL, M.A.; PINTO, A.C. Blood glucose- and triglyceride-lowering effect of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Cróton cajucara* Benth., in rats. **Diabetes, Obesity and Metabolism.** v.3, p. 452-456, 2001.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18 (4), 618-626, 2008.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria coma academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 12 (1), 35-40, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arq. Bras. Cardiol**, 88 (suppl. I), 2-19, 2007.

SZKUDELSKI, T.; KANDULSKA, K. The effect of myo-inositol on ethanol-induced metabolic changes and insulin concentration in the rat. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 107, n° 04, p. 334-337, 1999.

TAKAHASHI, Y.; INABA, N.; KUWAHARA, S.; KUKI, W. Effects of γ -terpinene on lipid concentrations in serum using triton WR-1339-treated rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 67, 2448-2450, 2003.

TENNANT, D.R.; O' CALLAGHAN, M. Survey of usage and intakes of annatto extracts. **Food Research International**, v.38, p. 911 – 917, 2005.

THOLSTRUP, T. EHNHOLM, C.; JAUHAINEN, M.; PETERSEN, M.; CARL-ERIK, H.; LUND, P. *et.al.* Effects of the medium-chain fatty acids and oleic acid on blood lipids, lipoproteins, glucose, insulin, and lipid transfer protein activities. **The American Journal of Clinical Nutrition** 79, 564-569, 2004.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** 42(2), 289-306, 2006.

TUROLLA, M.R.S. **Avaliação dos aspectos toxicológicos dos fitoterápicos: um estudo comparativo.** Dissertação. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 3 (2), 93-98, 2006.

VEIGA-JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C. MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova** 28 (3), 519-528, 2005.

VILLAR.; CALLEJA, J.M.; MORALES, C.; CACERES, A. Screening of 17 Guatemalan medicinal plants for platelet antiaggregant activity. **Phytotherapy Research** 11, 441-445, 1997.

WASAN, K.M.; SUBRAMANIAN, R.; KWONG, M.; GOLDBERG, I.J.; WRIGHT, T.; JONSTON, T. Poloxamer 407-mediated alterations in the activities of enzymes regulating lipid metabolism in rats. **J Pharm. Pharmaceut. Sci.** 6 (2), 189-197, 2003.

WHO. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Evaluation of national assessments of intake of annatto extracts (bixin). **WHO Food additive Series** 44, 485-492, 2000.

WILLS, D.E. **Biochemical Basis of Medicine**. 3rd Edition., John Wright and Sons Ltd., Bristol, England, 267-268, 1995.

WILSON, T.A.; NICOLOSI, R.J.; WOOLFREY, B.; KRITCHEVSKY, D. Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. **Journal of Nutritional Biochemistry** 18, 105-112, 2007.

XAVIER, H.T. Associação de medicamentos: estatinas e fibratos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 85 (supl. V), 2005.

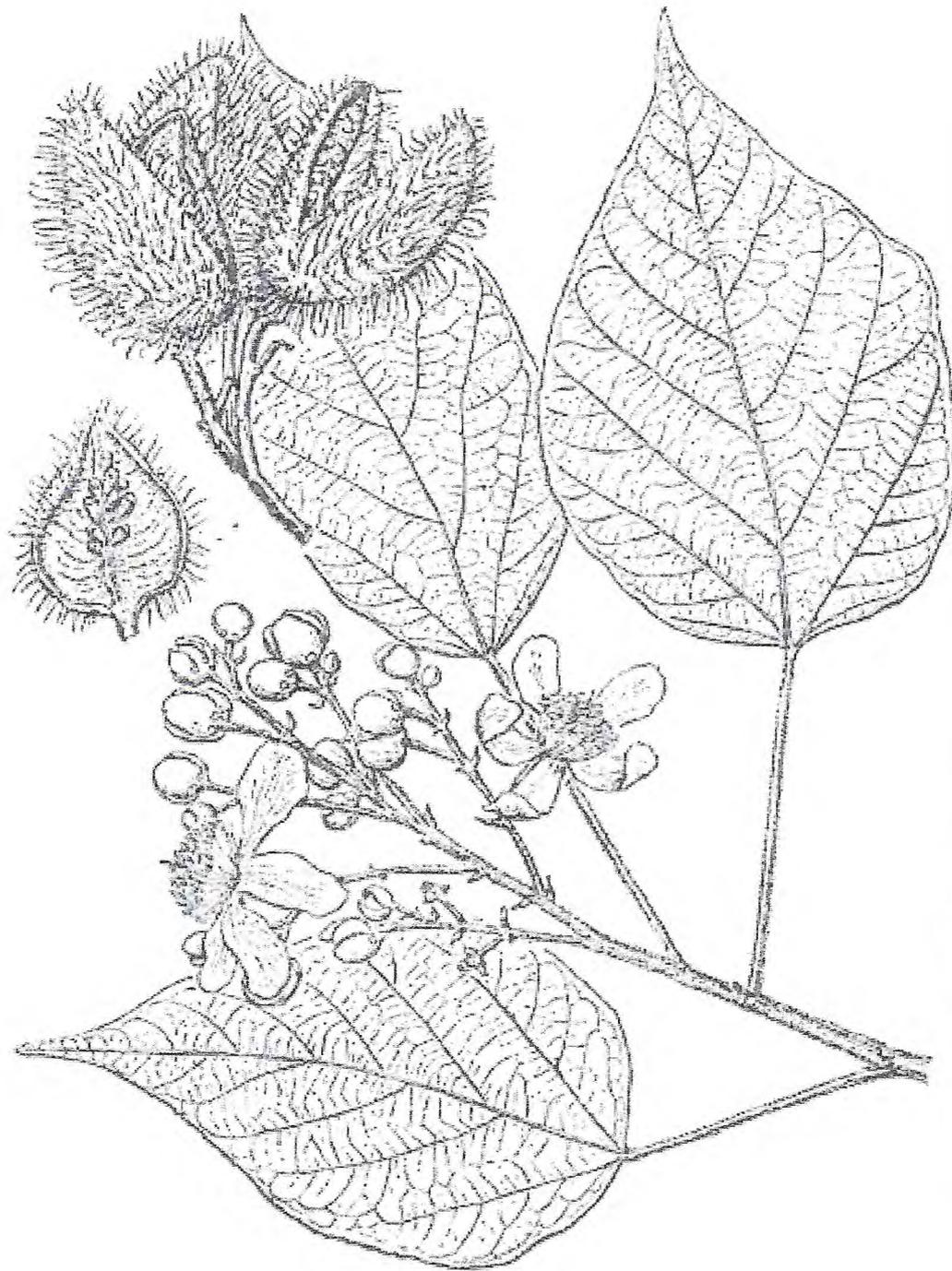
YAKUBU M.T.; AKANJI M.A.; OLADIJI A.T. Haematological evaluation in male albino rats following chronic administration of aqueous extract of *Fadogia agrestis* stem. **Pharmacog. Mag.** 3, 34-38, 2007.

YOU, M. & CRABB, D.W. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver: role of sterol regulatory element-binding proteins. **Alcohol** 34,39-43, 2004.

YU, B.Y.; CRONHOLM, T. Coupling of ethanol metabolism to lipid biosynthesis: labeling of the glycerol moieties of sn-glycerol-3-phosphate, a phosphatidic acid and a phosphatidylcholine in liver of rats given [1,1 - $^2\text{H}_2$] ethanol. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1344, p. 165-170, 1997.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova** 24 (1), 147-152, 2001.

ZILVA, J.F.; PANMALL, P.R.; MAYNE, P.D. **Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment**, 5th ed. England Clays Ltd., St. Ives, Plc, London, 1991.



A
N
E
X
O
S

ANEXOS

ANEXO 1

Trabalhos publicados em periódicos durante a vigência do doutorado:

1) LINO, C.S.; SALES, T.P.; OLIVEIRA ALEXANDRE, F.S.; FERREIRA, J. M.; SOUSA, D.F.; GOMES, P.B.; AMARAL, J.F.; MAIA, F.D.; SILVEIRA, E.R.; QUEIROZ, M.G.R.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B. Antioxidant Activity of a *Cissus verticillata* Fraction and Tyramine, its Bioactive Constituent, on Alloxan-Induced Diabetic Rats. **The Open Pharmacology Journal**. , v.2, p.63 - 69, 2008.

2) LIMA, F.C., SOUSA, D.F., FERREIRA, J. M., LIMA Jr, R. C. P., TOME, A. R., LEAL-CARDOSO, J.H., QUEIROZ, M G R, CAMPOS, A. R. Croton zehntneri essential oil prevents acetaminophen-induced acute hepatotoxicity in mice. **Records of Natural Products**. , v.2, p.135 - 2008.

3) LINO, C.S.; SALES, T.P.; GOMES, P.B.; AMARAL, J.F.; ALEXANDRE, F S O; SILVEIRA, E R; FERREIRA, J. M.; SOUSA, D F; QUEIROZ, M.G.R; SOUSA, F.C.F.; BRITO, G.A.C.; BRITO, S.M.R.C.; VIANA, G.S.B. Anti-diabetic activity of a fraction from *Cissus verticillata* and tyramine, its main bioactive constituent, in alloxan-induced diabetic rats. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**. v.2, p.178 - 188, 2007.

4) Ferreira, P.M.P., CARVALHO, A.F.F.U., SOUSA, D.F., FERREIRA, J. M., MARTINS, A.R., MARTINS, A.M.C., QUEIROZ, M.G.R. Water extract of *Moringa oleifera* seeds: a toxicological approach. **Pesquisa Médica (UFC)**. v.1, p.45 - 53, 2007.

Trabalhos a serem publicados oriundos da tese:

1) Effects of the *Bixa orellana* seeds on hyperlipidemia – Phytotherapy Research.

2) Toxicological evaluation of the effects of the aqueous suspension of *Bixa orellana* seeds in rats – Drug and Chemical Toxicology.

ANEXO 2

Resumos enviados para congressos durante a vigência do doutorado:

1) MORAIS, T M F ; PAIXÃO, P.H.E. ; NASCIMENTO, D.S. ; PARENTE, A.M.L. ; ROCHA, M.V.A.P. ; SOUSA, D.F. ; **FERREIRA, J. M.** ; ALVES, R. S. ; MELO, C. L. ; QUEIROZ, M.G.R. Prevalência bacteriana em uroculturas de pacientes com antígeno prostático específico elevado. In: 37º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e 10º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, 2010, Goiânia. Cd de resumos, 2010.

2) LIMA, P.O.; CANDIDO, M.J.D.; MORAIS, D.A.E.F.; QUEIROZ, M. G. R.; MODESTO, E.C.; **FERREIRA, J. M.** Glicose sérica em bezerras recebendo diferentes dietas líquidas. In: 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2009, Maringá. Cd de Resumos, 2009.

3) **FERREIRA, J. M.** ; SOUSA, D F ; BRUNO, P.A.M. ; MARTINS, A. R. ; DANTAS, M.B. ; MORAIS, T M F ; ARRUDA-FILHO, A. C. V. ; ADRIANO, L.S. ; FONSECA, S. G. C. ; QUEIROZ, M G R . Efeito do extrato aquoso das sementes de *Bixa orellana* sobre o metabolismo lipídico de animais com dislipidemia induzida por poloxamer-407. In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2009, Águas de Lindóia - SP. Livro de Resumos, 2009.

4) **FERREIRA, J. M.** ; MARTINS, A. R. ; BRUNO, P.A.M. ; SOUSA, D F ; DANTAS, M.B. ; MORAIS, T. M. F ; ARRUDA-FILHO, A. C. V. ; VASCONCELOS, T.O. ; FONSECA, S. G. C. ; QUEIROZ, M G R . Perfil hematológico de animais tratados com extrato aquoso das sementes de *Bixa orellana* durante 90 dias. In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2009, Águas de Lindóia - SP. Livro de Resumos, 2009.

5) MELO, T.S. ; MORAIS, T M F ; MELO, C. L. ; LIMA, P.R. ; **FERREIRA, J. M.**; FROTA, J.T. ; SANTOS, F.A. ; QUEIROZ, M G R ; PESSOA, O.D.L. ; RAO, V.S. . Estudo da ação terapêutica do ácido betulínico no diabetes induzido por aloxano em camundongos. In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2009, Águas de Lindóia - SP. Livro de Resumos, 2009.

6) **FERREIRA, J. M.** ; BRUNO, P.A.M. ; SOUSA, D F ; MARTINS, A. R. ; ADRIANO, L.S. ; MORAIS, T M F ; BARROSO, M.T. ; Fonseca, S.G.C. ; MELO, C. L. ; QUEIROZ, M G R . Avaliação do perfil lipídico e glicêmico de ratos após tratamento agudo com extrato aquoso das sementes de *Bixa orellana*. In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2009, Águas de Lindóia - SP. Livro de Resumos, 2009.

7) XIMENES, R.M. ; **FERREIRA, J. M.** ; SOUSA, D.F. ; LEITE, C.A.V.G. ; SIQUEIRA, R.J.B. ; SOUSA, P.C.P. ; PRACIANO, T.P. ; ALVES, R. S. ; HAVT, A. ; MONTEIRO, H S A . Avaliação dos efeitos do veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a pressão arterial em ratos anestesiados. In: XXIV Reunião Anual da Federação de

Sociedades de Biologia Experimental, 2009, Águas de Lindóia - SP. Cd de Resumos, 2009.

8) NETO, J. N. F. G. ; Morais, T. M. F ; **FERREIRA, J. M.** ; SOUSA, D.F. ; DANTAS, M.B. ; MELO, T.S. ; MARTINS, A. R. ; Fonseca, S.G.C. ; BRUNO, P.A.M. ; QUEIROZ, M G R . Avaliação do efeito hipolipemiante da suspensão aquosa do epicarpo de *Passiflora edulis* (maracujá) em camundongos. In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2009, Águas de Lindóia - SP. Livro de Resumos, 2009.

9) LIMA, P.O. ; CANDIDO, M.J.D. ; MORAIS, D.A.E.F. ; QUEIROZ, M.G.R. ; MODESTO, E.C. ; **FERREIRA, J. M.** . Parâmetros séricos de bezerros recebendo diferentes dietas líquidas. In: 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2009, Maringá. Livro de Resumos, 2009.

10) MELO, C. L. ; ARRUDA-FILHO, A. C. V. ; **FERREIRA, J. M.** ; ALVES, R. S. ; MARTINS, R. D. ; XIMENES, R.M. ; ROCHA, M.V.A.P. ; QUEIROZ, M.G.R. . Determinação laboratorial de creatinina sérica: um estudo comparativo de técnicas analíticas. In: 7º Congresso Regional de Análises Clínicas do Nordeste, 2009, Recife - PE. Cd de resumos, 2009.

11) **FERREIRA, J. M.** ; QUEIROZ, M.G.R. ; SOUSA, D.F. ; PEREIRA, N.B.S. ; Morais, T. M. F ; BRUNO, P.A.M. ; ADRIANO, L.S. . Efeito hipotrigliceridêmico da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* em animais com dislipidemia induzida por Poloxamer-407. In: XIV Semana Universitária da Universidade Estadual do Ceará, 2009, Fortaleza - CE, 2009.

12) MORAIS, T M F ; BRUNO, P.A.M. ; NETO, J. N. F. G. ; MELO, P. A. M. ; MELO, T.S. ; **FERREIRA, J. M.** ; FONSECA, S. G. C. ; QUEIROZ, M.G.R. . Avaliação do efeito hipolipemiante da suspensão aquosa do epicarpo de *Passiflora edulis* (maracujá) em camundongos. In: XXVIII Encontro de Iniciação Científica, 2009, Fortaleza - CE, 2009.

13) PEREIRA, N.B.S. ; **FERREIRA, J. M.** ; Morais, T. M. F ; BRUNO, P.A.M. ; SOUSA, D.F. ; FONSECA, S. G. C. ; QUEIROZ, M.G.R. . Estudo do efeito da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana* em camundongos com hipercolesterolemia induzida por ração modificada. In: XXVIII Encontro de Iniciação Científica, 2009, Fortaleza - CE, 2009.

14) BRUNO, P.A.M. ; **FERREIRA, J. M.** ; MORAIS, T M F ; SOUSA, D.F. ; ADRIANO, L.S. ; PEREIRA, N.B.S. ; QUEIROZ, M.G.R. . Avaliação do potencial hipoglicemiante da suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana*. In: XXVIII Encontro de Iniciação Científica, 2009, Fortaleza - CE. ., 2009.

15) SOUSA, D.F., BRITO, T.S., BATISTA-LIMA, F.J., JORGE, A.R.C., **FERREIRA, J. M.**, CHAGAS, J.F., PRACIANO, T.P., NORÕES, T.B., XIMENES, R.M., ALVES, C.D., BORGES-NOJOSA, D.M., MAGALHÃES, P.J.C., MONTEIRO, H S A. *Bothrops lutzi* venom promotes relaxation on isolated rat aorta In: XVI World Congress of the International Society on Toxinology and X Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia, Cabo de Santo Agostinho - PE , 2009.

- 16)** SOUSA, D.F., JORGE, A.R.C., CHAGAS, J.F., PRACIANO, T.P., FERREIRA, J. M., NORÕES, T.B., SOUSA, P.C.P., XIMENES, R.M., ALVES, C. D., ALVES, R. S., QUEIROZ, M G R, MENEZES, D.B., BORGES-NOJOSA, D.M., HAVT, A., MONTEIRO, H S A. Study in vitro of renal effects of *Bothrops lutzi* venom In: XVI World Congress of the Internacional Society on Toxinology and X Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia, Cabo de Santo Agostinho - PE, 2009.
- 17)** FILHO, V. C. B., MENEZES, R.R.P.P.B., DANTAS, M B, MARTINS, A. R., MORAIS, T M F, TOMAZ, C C, MARTINS, G A A, SOUSA, D F, FERREIRA, J. M., SOUSA, E. A., LIMA, A. B., QUEIROZ, M G R. Anthropometrics indexes and biochemical parameters of teenagers with excess weight of a public school in Fortaleza, Ceará. In: XX International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, XXXV Brazilian Congress of Clinical Analysis and VIII Brazilian Congress of Clinical Citology, Fortaleza-CE, 2008.
- 18)** SANTOS, M.S.M., MENEZES, R.R.P.P.B., SOUSA, D F, FERREIRA, J. M., MARTINS, A. R., DANTAS, M B, MORAIS, T. M. F, TOMAZ, C.C, MARTINS, G A A, ARRUDA-FILHO, A. C. V., MELO, C. L., QUEIROZ, M G R. Biochemistry and hematological profile of patients attended in a center of burn patients treatment in state of Ceará In: XX Internacional Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, XXXV Brazilian Congress of Clinical Analysis and VIII Brazilian Congress of Clinical Citology, Fortaleza-CE, 2008.
- 19)** VITOR, A.O., SOARES, P.M., MENEZES, J.B.F., SOUSA, D F, FERREIRA, J. M., QUEIROZ, M G R, VASCONCELOS, S.M.M., CARDI, B.A., CARVALHO, K.M. Efeito analgésico de uma substância esteroideal do veneno do *Bufo paracnemis* na dor neuropática In: III Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, Fortaleza, 2008.
- 20)** SOARES, P.M., VITOR, A.O., FERREIRA, J. M., SOUSA, D F, ESCUDEIRO, S.S., LIMA, N.M., MONTEIRO, V.S., PEREIRA, E.C., TEIXEIRA, M.A., QUEIROZ, M G R, CARVALHO, K.M., VASCONCELOS, S.M.M. Estudo da interferência do etanol na via de sinalização adenosínica em camundongos In: III Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, Fortaleza, 2008.
- 21)** NETO, J. N. F. G., MARTINS, A. R., PEREIRA, J. F., FERREIRA, J. M., SOUSA, D F, SILVA, C. R., MORAIS, T M F, DANTAS, M B, TOMAZ, C C, MARTINS, G A A, LEMOS, T L G, QUEIROZ, M.G.R. Evaluation of hypoglicemiant effect of the aqueous suspension of *Passiflora edulis* in mice with diabetes induced by alloxan In: XX International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, XXXV Brazilian Congress of Clinical Analysis and VIII Brazilian Congress of Clinical Citology, Fortaleza-CE, 2008.
- 22)** ALVES, P. C., PEREIRA, J. F., SILVA, C. R., MORAIS, T M F, SOUSA, D F, MARTINS, A. R., MARTINS, G A A, TOMAZ, C C, FERREIRA, J. M., QUEIROZ, M G R. Incidence investigation of urinary sediment alterations in patients attended in a public hospital of Ceará - Brazil In: XX International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, XXXV Brazilian Congress of Clinical Analysis and VIII Brazilian Congress of Clinical Citology, Fortaleza-CE, 2008.

- 23) DANTAS, M B, MORAIS, T M F, FILHO, V. C. B., FERREIRA, J. M., SOUSA, D F, MARTINS, A. R., MARTINS, G A A, TOMAZ, C C, MENEZES, R.R.P.P.B., SOUSA, E. A., LIMA, A. B., QUEIROZ, M.G.R.** Lipid and glycemic profile of teenagers with overweight and obesity submitted to regular physical exercises In: XX International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, XXXV Brazilian Congress of Clinical Analysis and VIII Brazilian Congress of Clinical Citology, Fortaleza-CE, 2008.
- 24) NOGUEIRA, A. L. N, MORAIS, T M F, MENEZES, R.R.P.P.B., MARTINS, A. R., SOUSA, D F, FERREIRA, J. M., ARRUDA-FILHO, A. C.V., MELO, C. L., TOMAZ, C C, MARTINS, G A A, DANTAS, M B, QUEIROZ, M.G.R.** Profile of patients infected by HIV-I and HIV-II attended in municipal service health in Fortaleza city In: XX International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, XXXV Brazilian Congress of Clinical Analysis and VIII Brazilian Congress of Clinical Citology, Fortaleza-CE, 2008.
- 25) FERREIRA, J. M., SOUSA, D F, MARTINS, G A A, TOMAZ, C C, MARTINS, A. R., MORAIS, T M F, DANTAS, M B, FONSECA, S. G. C., SOUSA, J.A.L., ARRUDA-FILHO, A. C. V., QUEIROZ, M G R.** Renal and hepatic functions study of animals treated with aqueous extract of *Bixa orellana L.* seeds In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil & X International Congress of Ethnopharmacology, São Paulo - SP, 2008.
- 26) ALVES, R. S., COSTA, K. C. S., MENEZES, R.R.P.P.B., MORAIS, T M F, FERREIRA, J. M., SOUSA, D F, HAVT, A., TOMAZ, C C, DANTAS, M B, SOARES, R.L., MELO, C. L., QUEIROZ, M G R.** Renal biomarkers in students of Federal University of Ceará In: XX Internacional Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, XXXV Brazilian Congress of Clinical Analysis and VIII Brazilian Congress of Clinical Citology, Fortaleza-CE, 2008.
- 27) NETO, J. N. F. G., MARTINS, A. R., SILVA, C. R., FERREIRA, J. M., SOUSA, D F, PEREIRA, J. F., TOMAZ, C C, DANTAS, M B, MORAIS, T M F, MARTINS, G A A, LEMOS, T L G, QUEIROZ, M G R.** Study of the hypolipidemic effect of the aqueous suspension of *Passiflora edulis* rind in mice with dyslipidemia induced by fructose In: XX Internacional Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, XXXV Brazilian Congress of Clinical Analysis and VIII Brazilian Congress of Clinical Citology, Fortaleza-CE, 2008.
- 28) SANTOS, M.S.M., SOUSA, D F, FERREIRA, J. M., ALVES, R S, MELO, C. L., MARTINS, A M C, QUEIROZ, M G R.** Alterações bioquímicas e hematológicas em pacientes grande-queimados In: 34° Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e 7° Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, Belo Horizonte, 2007.
- 29) CARMO, M.R.S., SOUZA, G. F., OLIVEIRA, E.M.R., SOUSA, D F, FERREIRA, J. M., MELO, C. L., MENEZES, D.B., QUEIROZ, M G R** Antiretroviral (ARV) therapy effect on lipic metabolism in HIV patients In: 6° Internacional Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP, Ribeirão Preto, 2007.
- 30) FERREIRA, J. M., SOUSA, D F, DANTAS, M B, MARTINS, A R, Martins, G. A. A., ALVES, C. D., TOMAZ, C C, Fonseca, S.G.C., Barreira, S.R.T., MARTINS, A M**

C, QUEIROZ, M G R. Atividade hipolipemiante do extrato aquoso das sementes de *Bixa orellana* em camundongos dislipidêmicos In: XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, Águas de Lindóia, 2007.

31) FERREIRA, J. M., TOMAZ, C C, SOUSA, D F, ALVES, C. D., MARTINS, A. R., MORAIS, T M F, DANTAS, M B, Fonseca, S.G.C., MENEZES, D.B., MARTINS, A M C, QUEIROZ, M G R. Comparative study of effects of aqueous and ethanolic extracts of *Bixa orellana* seeds on lipoproteic metabolism of mice with ethanol induced hypertriglyceridaemia In: 6° Internacional Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP, 2007, Ribeirão Preto, 2007.

32) FERREIRA, J. M., SOUSA, D F, ALVES, C. D., MARTINS, A R, MORAIS, T M F, DANTAS, M B, MENEZES, D.B., MARTINS, A M C, QUEIROZ, M G R. Comparative study of effects aqueous and ethanolic extracts of *Bixa orellana* seeds on lipoproteic metabolism of dyslipidemic mice In: 6° Internacional Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP, Ribeirão Preto, 2007.

33) RODRIGUES, A. S., MOUSINHO, R. F., SOUSA, D F, FERREIRA, J. M., ALVES, R. S., MELO, C. L., ROCHA, M V A P, QUEIROZ, M G R. Correlação da microalbuminúria com marcadores glicêmicos, lipídicos e de função renal In: 34° Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e 7° Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, Belo Horizonte, 2007.

34) MORAIS, T M F, FERREIRA, J. M., RODRIGUES, A. S., SOUSA, D F, MARTINS, A. R., DANTAS, M B, MENEZES, D.B., ALVES, C. D., TOMAZ, C C, ROCHA, M V A P, QUEIROZ, M G R. Correlation of levels of microalbuminuria with glycemia, dyslipidemia and renal function markers In: 6° Internacional Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP, Ribeirão Preto, 2007.

35) SOUSA, D F, PEIXOTO-NEVES, D., FERREIRA, J. M., Martins, G. A. A., MORAIS, T M F, TOMAZ, C C, MARTINS, A M C, LEAL-CARDOSO, J.H., QUEIROZ, M G R. Efeito do anetol sobre o metabolismo lipídico de camundongos dislipidêmicos In: XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, Águas de Lindóia, 2007.

36) MARTINS, A. R., PEIXOTO-NEVES, D., FERREIRA, J. M., SOUSA, D F, Morais, T. M. F, TOMAZ, C C, ALVES, C. D., DANTAS, M B, Martins, G. A. A., MARTINS, A M C, LEAL-CARDOSO, J.H., QUEIROZ, M G R. Efeito do eugenol sobre a dislipidemia induzida por etanol In: XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, Águas de Lindóia, 2007.

37) DANTAS, M B, FERREIRA, J. M., SOUSA, D F, MARTINS, A R, ALVES, C. D., Morais, T. M. F, Fonseca, S.G.C., Barreira, S.R.T., MARTINS, A M C, QUEIROZ, M G R. Efeito do extrato etanólico de *Bixa orellana* sobre o metabolismo lipídico de camundongos dislipidêmicos In: XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, Águas de Lindóia, 2007.

38) MAIA, A. D, DANTAS, M B, FERREIRA, J. M., SOUSA, D F, MARTINS, A R, TOMAZ, C C, MARTINS, G A A, NASCIMENTO, N R F, MENDONÇA, M.R.K., MENEZES, D.B., MARTINS, A M C, QUEIROZ, M G R. Evaluation of the

hypoglicemiant effect of the hydroalcoholic extract from leaves of *Petiveria alliacea L.* In: 6° Internacional Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP, Ribeirão Preto, 2007.

39) FERREIRA, P.M.P., SOUSA, D F, **FERREIRA, J. M.**, MARTINS, A. R., MORAIS, T M F, ALVES, C. D., DANTAS, M B, MARTINS, A M C, QUEIROZ, M G R. Hematological, biochemistry and histological profile of rats treated with *Moringa oleifera* seeds: a toxicological approach In: 6° Internacional Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP, Ribeirão Preto, 2007.

40) SOUZA, G. F., MEIRELES, M. M., **FERREIRA, J. M.** Implantação da imunofluorescência indireta do HIV no Laboratório de Especialidades Médicas José de Alencar (CEMJA) In: 34° Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e 7° Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, Belo Horizonte, 2007.

41) SOUSA, D F, REGO, D.P, MENEZES, D.B., **FERREIRA, J. M.**, MARTINS, A R, TOMAZ, C C, Martins, G. A. A., MORAIS, T M F, ALVES, C. D., MARTINS, A M C. Lipidic profile of elderly persons living in a philanthropic institution in Fortaleza (CE) In: 6° Internacional Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP, Ribeirão Preto, 2007.

42) CARMO, M. R. S., SOUZA, G. F., SOUSA, D F, OLIVEIRA, E.M.R., **FERREIRA, J. M.**, QUEIROZ, M G R. Perfil lipídico de pacientes portadores do vírus HIV atendidos no Laboratório Central de Fortaleza In: 34° Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e 7° Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, Belo Horizonte, 2007.

43) ALVES, C. D., FERREIRA, P.M.P., SOUSA, D F, **FERREIRA, J. M.**, MARTINS, G A A, Morais, T. M. F, TOMAZ, C C, MARTINS, A R, DANTAS, M B, MARTINS, A M C, CARVALHO, A F U, QUEIROZ, M G R. Perfil lipídico de ratos tratados com o extrato aquoso das sementes de *Moringa oleifera* In: XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, Águas de Lindóia, 2007.

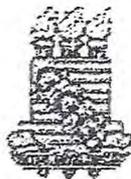
44) **FERREIRA, J. M.**, MARTINS, A R, SOUSA, D F, OLIVEIRA, F L S, TOMAZ, C C, QUEIROZ, M G R. Correlação dos níveis de Colesterol HDL e Colesterol LDL com as Apoproteínas AI e B em Crianças Obesas In: 40° Congresso Brasileiro de Patologia Clínica Medicina Laboratorial, Curitiba, 2006.

45) MORAIS, T M F, MARTINS, A R, **FERREIRA, J. M.**, SOUSA, D F, LEMOS, T L G, TOMAZ, C C, ALVES, C D, MARTINS, G A A, QUEIROZ, M G R, MARTINS, A M C. Efeito hipolipemiante do extrato aquoso de *Passiflora edulis* (MARACUJÁ). In: XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Salvador, 2006.

46) Morais, T. M. F, **FERREIRA, J. M.**, MARTINS, Amanda Roque, SOUSA, Daniel Freire de, QUEIROZ, Maria Goretti Rodrigues de, MARTINS, Alice Maria Costa, Tomaz, C.C, Martins, G. A. A., ALVES, C. D., Dantas, M.B. Estudo da atividade do extrato aquoso das sementes de *Bixa orellana* em animais com hipertrigliceridemia induzida por frutose In: XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil , Salvador, 2006.

- 47)** MARTINS, A R, SOUSA, D F, FERREIRA, J. M., ALVES, C D, MORAIS, T M F, TOMAZ, C C, MARTINS, G A A, DANTAS, M B, MARTINS, A M C, QUEIROZ, M G R. Estudo da atividade hipotrigliceridemiante do extrato aquoso das sementes de *Bixa orellana*. In: XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Salvador, 2006.
- 48)** FERREIRA, J. M., AZEVEDO, M C S, SOUSA, D F, ROCHA, M V A P, MARTINS, A M C, QUEIROZ, M G R. Estudo da Correlação dos Marcadores de Hepatite B. In: 40° Congresso Brasileiro de Patologia Clínica Medicina Laboratorial, Curitiba, 2006.
- 49)** FERREIRA, P M P, CARVALHO, A F U, SOUSA, D F, ARAÚJO, G A, FERREIRA, J. M., MARTINS, A M C, QUEIROZ, M G R, COSTA, P. Estudo da Toxicidade Hepática, Renal e Pancreática do Extrato Aquoso das sementes de *Moringa oleifera* LAMARCK In: XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Salvador, 2006.
- 50)** MARTINS, A R, SOUSA, D F, FERREIRA, J. M., MORAIS, T M F, DANTAS, M B, ALVES, C D, TOMAZ, C C, MARTINS, G A A, QUEIROZ, M G R, MARTINS, A M C. Estudo das alterações da função renal em animais com dislipidemia induzida por Triton tratados com extrato aquoso das sementes de *Bixa orellana*. In: XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Salvador, 2006.
- 51)** FERREIRA, J. M., MARTINS, A R, CARDOSO, F A S, OLIVEIRA, F L S, SOUSA, D F, QUEIROZ, M G R. Estudo dos Principais Fatores de Riscos Cardiovasculares associados ao Perfil Lipídico em Crianças Obesas In: 40° Congresso Brasileiro de Patologia Clínica Medicina Laboratorial, Curitiba, 2006.
- 52)** FERREIRA, J. M., ALVES, C D, CAVALCANTE, J E A, MARTINS, G A A, SOUSA, D F, MARTINS, A M C. Perfil Glicêmico de Idosos Residentes em um Abrigo na Cidade de Fortaleza (CE) In: 40° Congresso Brasileiro de Patologia Clínica Medicina Laboratorial, Curitiba, 2006.
- 53)** FERREIRA, J. M., ALVES, C D, SOUSA, D F, CAVALCANTE, J E A, MARTINS, G A A, MARTINS, A M C. Prevalência de Dislipidemias em Idosos residentes em um abrigo na Cidade de Fortaleza (CE) In: 40° Congresso Brasileiro de Patologia Clínica Medicina Laboratorial, Curitiba, 2006.
- 54)** PEDRO, Socorro, SOUSA, Daniel Freire de, FERREIRA, J. M., MARTINS, Amanda Roque, MENESES, Dalgimar Bezerra de, QUEIROZ, Maria Goretti Rodrigues de, MARTINS, Alice Maria Costa. Profile of patients with acute lymphocytic leukemia (ALL) and non - Hodgkin lymphoma (NHL) treated at an out-patient chemotherapeutic unit of Albert Sabin child hospital - CE. Preliminary study. In: World Congress of Pharmaceutical Sciences and 66th Congress of FIP, Salvador, 2006.

ANEXO 3



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366-8331 Fax (85) 3366-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 48/07, sobre o projeto intitulado: “AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS SEMENTES DE BIXA ORELLANA NO TRATAMENTO DE DISLIPIDEMIAS E DIABETES.” de responsabilidade da profa. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal CEPA em reunião realizada em 11 de abril de 2007.

Fortaleza, 12 de abril 2007

Profa. Dra. Geannê Matos de Andrade Cunha
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

Tabela resumo dos parâmetros hematológicos no estudo toxicológico de doses repetidas por 30 e 90 dias.

Parâmetros Hematológicos	Grupos experimentais					
	Coleta 30 dias			Coleta 90 dias		
	SABO 200	SABO 400	SABO 800	SABO 200	SABO 400	SABO 800
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	-	-	-	-	-	-
Hemoglobina (g/dL)	-	-	-	-	-	-
Hematócrito (%)	-	-	-	-	-	-
VCM (fL)	-	-	-	-	-	-
CHCM (g/dL)	-	-	-	-	-	-
HCM (pg)	-	-	-	-	-	-
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	-	-	-	-	-	-
Linfócitos (%)	-	-	-	-	-	-
Segmentados (%)	-	-	-	-	-	-
Monócitos (%)	-	-	-	-	-	-
Eosinófilos (%)	-	-	-	-	-	-
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	-	-	-	-	-	-

SABO = suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana*, VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média, HCM = hemoglobina corpuscular média.

↓ = redução, ↑ = aumento, - = nada ocorreu

Tabela resumo dos parâmetros bioquímicos no estudo toxicológico de doses repetidas por 30 e 90 dias.

Parâmetros Bioquímicos	Grupos experimentais					
	Coleta 30 dias			Coleta 90 dias		
	SABO 200	SABO 400	SABO 800	SABO 200	SABO 400	SABO 800
Glicose (mg/dL)	-	↑(17,7%)	-	-	-	↑(28,1%)
Colesterol Total (mg/dL)	-	-	-	-	-	-
Colesterol - HDL (mg/dL)	-	-	-	-	-	-
TG (mg/dL)	-	-	-	-	-	-
Uréia (mg/dL)	-	-	-	-	-	-
Creatinina (mg/dL)	-	-	-	-	-	-
Ácido úrico (mg/dL)	-	-	-	-	-	-
AST (U/L)	-	-	↓(16,3%)	-	↓(19,5%)	↓(18,2%)
ALT (U/L)	-	-	↓(18,2%)	-	-	-
Fosfatase alcalina (U/L)	↓(30,6%)	↓(40,4%)	↓(48,1%)	↓(21,5%)	↓(17,2%)	↓(18,4%)
Amilase (U/L)	-	-	-	-	-	-
Proteínas Totais (g/dL)	-	-	-	-	-	-
Albumina (g/dL)	-	-	-	-	-	-
Sódio (mmol/L)	-	-	-	-	-	-
Potássio (mmol/L)	-	-	-	-	-	-
Cloreto (mmol/L)	-	-	-	-	-	-

SABO = suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana*, AST = aspartato aminotransferase, ALT = alanina aminotransferase
 ↓ = redução, ↑ = aumento, - = nada ocorreu

Tabela resumo dos resultados obtidos no protocolo de dislipidemia induzida por Triton WR-1339.

Grupos Experimentais	Parâmetros Bioquímicos			
	Coleta 24h		Coleta 48h	
	TG	CT	TG	CT
Triton WR-1339	↑(3528,7%)	↑(420,5%)	↑(1022,4%)	↑(195,3%)
Gemfibrozil	↓ (51,9%)	↓(24,4%)	↓(69,8%)	↓(50,6%)
SABO 200	-	-	↓(59,1%)	-
SABO 400	↓ (47,5%)	-	↓(50,7%)	-
SABO 800	↓(56,4%)	-	↓(55,4%)	-

TG = triglicerídeos, CT = colesterol total, SABO = suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana*.

↓ = redução, ↑ = aumento, - = nada ocorreu

Tabela resumo dos resultados obtidos no protocolo de hipertrigliceridemia induzida por etanol.

Grupos Experimentais	Parâmetros Bioquímicos	
	TG	CT
Etanol	↑(133,0%)	-
SABO 200	-	-
SABO 400	↓(36,6%)	-
SABO 800	↓(62,2%)	-

TG = triglicerídeos, CT = colesterol total, SABO = suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana*.

↓ = redução, ↑ = aumento, - = nada ocorreu

Tabela resumo dos resultados obtidos no protocolo de dislipidemia induzida Poloxamer-407.

Grupos Experimentais	Parâmetros Bioquímicos								
	Coleta 24h			Coleta 48h			Coleta 72h		
	GL	TG	CT	GL	TG	CT	GL	TG	CT
Poloxamer-407	↑(121,3%)	↑(7087%)	↑(495,4%)	-	↑(3138%)	↑(411,2%)	-	↑(959,6%)	↑(245,8%)
Gemfibrozil	-	-	-	↓(15,5%)	-	-	-	↓(33,4%)	↓(22,9%)
SABO 200	↓(20,2%)	-	-	↓(13,3%)	-	-	-	↓(38,6%)	-
SABO 400	↓(39,3%)	↓(18,8%)	-	↓(15,0%)	↓(36,9%)	-	-	↓(68,2%)	-
SABO 800	↓(24,6%)	-	-	↓(15,8%)	↓(28,1%)	-	-	↓(58,0%)	-
Poloxamer-407	↑(104,2%)	↑(9841%)	↑(482,3%)	-	↑(2529%)	↑(459,8%)	-	↑(1373%)	↑(361,4%)
HX	-	-	-	-	-	-	-	↓(43,4%)	-
AC	-	-	-	-	-	-	-	↓(38,3%)	-
CLO	-	-	-	-	↓(24,3%)	-	-	↓(47,6%)	↓(34,0%)
N-BUT	-	-	-	-	↓(25,8%)	-	-	↓(32,4%)	-

GL = glicose, TG = triglicerídeos, CT = colesterol total, HX = partição hexânica, AC = partição acetato de etila, CLO = partição clorofórmica, N-BUT = partição n-butanólica.

↓ = redução, ↑ = aumento, - = nada ocorreu

Tabela resumo dos resultados obtidos no protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.

Grupos Experimentais	Parâmetros Bioquímicos								
	GL	TG	CT	AST	ALT	UR	CREA	AMI	LIP
Ração hipercalórica	-	↓(46,4%)	↑(64,8%)	-	-	-	-	-	-
Sinvastatina	-	↓(51,0%)	↓(12,6%)	-	-	-	-	-	-
Veículo	-	↓(51,7%)	-	-	-	-	-	-	-
SABO 200	-	↓(49,5%)	↓(10,3%)	-	-	-	-	-	-
SABO 400	-	↓(46,5%)	↓(8,3%)	-	-	-	-	-	-
SABO 800	-	↓(39,8%)	↓(11,2%)	-	-	-	-	-	-
CLO 1	-	↓(46,3%)	-	↑(20,2%)	-	-	-	-	-
CLO 2	-	↓(43,9%)	-	↑(23,9%)	-	-	-	-	-
CLO 3	-	↓(45,5%)	↓(16,7%)	↑(24,2%)	-	-	-	-	-

GL = glicose, TG = triglicerídeos, CT = colesterol total, AST = aspartato aminotransferase, ALT = alanina aminotransferase, UR = uréia, CREA = creatinina, AMI = amilase, LIP = lipase, SABO = suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana*, CLO = partição clorofórmica, ↓ = redução, ↑ = aumento, - = nada ocorreu

Valores de F dos parâmetros hematológicos e bioquímicos no estudo toxicológico

Parâmetros	Grupos experimentais	
	Coleta 30 dias	Coleta 90 dias
	Valor de F	Valor de F
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	0,77	0,19
Hemoglobina (g/dL)	0,79	0,27
Hematócrito (%)	0,90	0,02
Volume Corpuscular Médio (fL)	0,57	1,21
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (g/dL)	2,67	0,87
Hemoglobina Corpuscular Média (pg)	2,41	0,68
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	1,51	2,15
Linfócitos (%)	2,64	1,83
Segmentados (%)	1,89	0,44
Monócitos (%)	1,87	2,75
Eosinófilos (%)	1,13	0,46
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	2,75	1,46
Glicose (mg/dL)	5,26	4,42
Colesterol Total (mg/dL)	1,58	1,09
Colesterol - HDL (mg/dL)	0,23	0,30
Triglicerídeos (mg/dL)	2,72	2,11
Uréia (mg/dL)	0,16	1,68
Creatinina (mg/dL)	1,04	2,55
Ácido úrico (mg/dL)	0,31	0,36
Aspartato aminotransferase (U/L)	3,05	4,89
Alanina aminotransferase (U/L)	3,03	1,94
Fosfatase alcalina (U/L)	21,65	8,29
Amilase (U/L)	1,49	0,58
Proteínas Totais (g/dL)	1,05	2,11
Albumina (g/dL)	1,87	0,72
Sódio (mmol/L)	1,55	2,78
Potássio (mmol/L)	2,31	2,99
Cloreto (mmol/L)	3,3	3,19

Valores de F dos protocolos experimentais de indução de dislipidemia

Protocolos experimentais	Parâmetros Bioquímicos								
	Coleta 24h			Coleta 48h			Coleta 72h		
	GL	TG	CT	GL	TG	CT	GL	TG	CT
Triton WR-1339	N/A	18,42	37,23	N/A	8,38	15,09	N/A	N/A	N/A
Poloxamer-407 (SABO)	16,66	75,30	145,90	5,30	38,87	101,2	1,03	31,18	22,12
Poloxamer-407 (Partições)	30,34	161,4	216,0	2,28	40,20	101,50	2,58	21,23	29,59

Protocolos experimentais	Parâmetros Bioquímicos								
	GL	TG	CT	AST	ALT	Uréia	CREA	Amilase	Lipase
Ração Hipercalórica (SABO)	1,82	12,80	30,66	2,01	2,13	0,84	0,25	2,33	0,74
Ração Hipercalórica (CLO)	1,30	14,48	20,95	3,95	1,41	1,59	0,52	2,73	1,23
Etanol	N/A	10,40	1,83	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A = não se aplica, GL = glicose, TG = triglicerídeos, CT = colesterol total, AST = aspartato aminotransferase, ALT = alanina aminotransferase, CREA = creatinina, SABO = suspensão aquosa das sementes de *Bixa orellana*, CLO = partição clorofórmica.