

ESTUDO DO EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE URUCUM (*Bixa orellana* L.) SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE COLESTEROL, GLICOSE E TRIGLICÉRIDES EM RATOS WISTAR p.o.

JOÃO DANILO DE JESUS FERREIRA¹
ONOFRE FERREIRA DE CARVALHO²
PEDRO IVO SEBBA RAMALHO³
VINICIUS AUGUSTO DE SÁ⁴
GUSTAVO EDUARDO FRENEAU⁵
JOSÉ REALINO DE PAULA⁶
LUIZ CARLOS DA CUNHA⁷
NUSA DE ALMEIDA SILVEIRA⁸

- 1 Médico Veterinário, mestrando em Biologia ICB, Laboratório de Andrologia e Tecnologia do Sêmen da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, joadanilo@yahoo.com.br
- 2 Biomédico, mestrando em Biologia ICB/UFG., Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas, UFG, e-mail : onofre@mouse.com.br
- 3 Farmacêutico, mestrando em Biologia ICB, Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia/UFG Primeira Avenida esquina com Praça Universitária, e-mail: pedroivogo@bol.com.br
- 4 Médico Veterinário, mestrando em Biologia ICB/UFG., Laboratório de Andrologia e Tecnologia do Sêmen da Escola de Veterinária/UFG, e-mail: medveterinario@hotmail.com
- 5 Médico Veterinário, Professor Adjunto, Doutor do Departamento de Reprodução Animal da Escola de Veterinária/UFG, Laboratório de Andrologia e Tecnologia do Sêmen da Escola de Veterinária/UFG, e-mail: gfreneau@vet.ufg.br
- 6 Farmacêutico-bioquímico, Professor Adjunto, Doutor da Faculdade de Farmácia/UFG. Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia/UFG, Primeira Avenida esquina com Praça Universitária, e-mail: jrealino@farmacia.ufg.br
- 7 Farmacêutico-bioquímico, Professor Adjunto, Doutor, Coordenador do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia/UFG, Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia/UFG, Primeira Avenida esquina com Praça Universitária, e-mail: lccunha@farmacia.ufg.br
- 8 Nutricionista, Professora Adjunta, Doutora do Departamento de Ciências Fisiológicas do ICB/UFG., Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas/UFG, e-mail: nusa@icb1.ufg.br

INTRODUÇÃO

O Brasil é o 5º produtor mundial de medicamentos. Entretanto, 48% desta produção encontra-se distribuída perversamente para uma parcela de 15% da população, que tem renda mensal acima de 10 salários mínimos, e ape-

nas 16% da produção destina-se às necessidades de saúde dos 51% da população que tem renda abaixo de 4 salários mínimos. (RESOLUÇÃO 2000; RELATÓRIO DA CPI, 2000). Estas diferenças poderiam ser minimizadas pela adoção de medidas político-econômicas que valorizam a produção nacional de fármacos voltada ao atendimento das

camadas mais carentes, através do fortalecimento dos Parques Nacionais de Laboratórios Oficiais, incentivo a produção de genéricos, dentre outras possibilidades (BERMUDEZ, 1995; RELATÓRIO DA CPI, 2000).

Outra medida que apresenta considerável alcance e um potencial extraordinário, é o incentivo à produção de medicamentos fitoterápicos, que são medicamentos industrializados que contêm como princípio ativo, uma substância presente em plantas, tendo geralmente custo muitas vezes inferior aos fármacos sintéticos. "Enquanto nestes o custo de desenvolvimento pode chegar a US\$ 500 milhões e levar de 7 a 20 anos para que o produto final chegue ao mercado, no caso de um medicamento originado de planta, esse investimento é da ordem de apenas US\$ 35 milhões" (RELATÓRIO DA CPI, 2000).

Deve-se considerar também a alta biodiversidade do Brasil, aliada à intensa difusão no uso de remédios oriundos de plantas consideradas medicinais para o tratamento de diversas doenças. Este é o resultado do acúmulo de conhecimento durante milhares de anos nos quais o homem vem notando, em algumas plantas, propriedades terapêuticas as mais variadas (SCHENKEL, 1996).

É comum nos grandes centros urbanos encontramos bancas dos chamados raizeiros que comercializam tanto raízes, folhas e cascas quanto preparações destas, comumente denominadas "garrafadas". Esta prática tem aumentado devido a alguns fatores tais como: a crença, favorecida pela imprensa não especializada, de que produtos de origem natural são isentos de efeitos colaterais; uma tendência ao retorno ao uso de produtos de origem natural, atitude decorrente da difusão da consciência ecológica; o difícil acesso da população à assistência médica; e a dificuldade de acesso da população aos medicamentos (SCHENKEL, 1996).

É importante notar os riscos inerentes à utilização indiscriminada de produtos naturais como remédios pela população, uma vez que estes não são inócuos como intensamente difundido e podem apresentar efeitos danosos à saúde. A utilização de doses extremamente altas ou por períodos prolongados, ou ainda por via de administração incorreta, aumenta a probabilidade de causar efeitos tóxicos nos seres humanos.

Um dos fitoterápicos utilizados na medicina popular é a *Bixa orellana* L., o único membro da família das bixáceas, no Brasil é conhecida como Urucum. É um arbusto presente em toda a América tropical, atinge a altura média de 3,0 metros, tem folhas ovais-pontiagudas de até 20 cm de comprimento. Suas flores são grandes, hermafroditas e de cor azul, apresentando cinco sépalas nas extremidades dos galhos, são orbiculares, glandulosas na base; são decíduas, e formam fascículos; deles nascem cápsulas ovóides, com dois carpelos cobertos de espinhos flexíveis

contendo em média 52 sementes rodeadas de uma polpa mole, tenaz e vermelha (CUNHA *et al.*, 1973).

As substâncias corantes do urucum são a bixina de cor vermelha e a orellina de cor amarela. A bixina cristaliza em formas rômbricas, sendo pouco solúvel em água, álcool e éter. Apresenta a fórmula $C_{25}H_{24}O_5$ e quando tratado pelo ácido sulfúrico, produz coloração azul (HART, 1964).

Na medicina caseira é empírica sua utilização como antifebril, antidiarético, hemostático de ferimentos leves, a decocção das folhas é empregada em certas inflamações de garganta e anginas de caráter benigno. Atualmente o urucum, tem sido utilizado pela população como um possível agente hipolipidêmico (FUKUDA *et al.*, 1996). A bixina, substância corante e ativa do córtex da semente do urucum, é utilizada na coloração de vários alimentos industrializados, tais como as margarinas (SANTOS, 1958). O Urucum é largamente utilizado sob a forma de uma mistura denominada coloral, com emprego na culinária.

Este trabalho visou à avaliação dos efeitos da bixina sobre os níveis plasmáticos de glicose, triglicérides e colesterol total.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção de Amostras do Urucum

A obtenção da amostra teve início com a coleta do fruto do urucueiro, localizado no campus samambaia da UFG, variedade Bixa orellana L. registrada no herbário desta universidade sob o nº 11051.

Extração, Purificação e Doseamento

Utilizamos para a extração, uma amostra de três quilogramas de semente de urucum seca, madura e não triturada. Esta amostra foi submetida à extração por decocção sob agitação por uma hora para cada alíquota. A mistura de solventes utilizada foi clorofórmio-etanol 4:1. O extrato obtido foi então submetido à evaporação no evaporador rotatório (Marconi® MA-120) do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFG segundo APARNATHI (1997) e YABIKU (1992).

Paralelamente, foi realizada a purificação do extrato bruto para a obtenção do padrão de bixina. O teor de bixina nas sementes varia entre 1,6 a 5,5% de acordo com a variedade, com a localização geográfica, clima e altitude (CUNHA *et al.*, 1973, HART 1964, INGRAM & FRANCIS 1969). As sementes coletadas para este experimento apresentaram aproximadamente 4,9% de bixina. Uma amostra de 35g de sementes secas, maduras e não trituradas sofreu extração exaustiva, utilizando-se o aparelho de Soxlet, obtendo-se uma fração oleosa, denominada Fração I, que foi descartada. Em seguida, a mesma amostra sofreu extração com clorofórmio e, após evaporação e reciclagem do sol-

vente, obteve-se um concentrado denominado de Fração II. Esta fração foi então solubilizada com uma mistura de clorofórmio-acetona 1:1 e levada ao freezer por 24 horas para a cristalização. Após este período esta fração foi filtrada e novamente refrigerada até completa remoção do solvente. Este procedimento durou 72 horas, ou seja, três filtrações, o que resultou em cristas vermelho-púrpura de bixina (LEITE, 1996; SRINIVASULU, 1989). Livre de solvente, os cristais foram diluídos na dose utilizada para o tratamento dos animais.

Após a obtenção do extrato bruto e do padrão de bixina, passou-se à etapa de doseamento da substância no extrato. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da UFG com a utilização de um espectrofotômetro UV/VIS (Micronal® B-382), sendo que as leituras foram realizadas com comprimento de onda (λ) de 470 nm. Retirou-se uma alíquota do extrato e realizou-se uma diluição em série, obtendo-se ao final, cinco amostras com concentrações de extrato variando de 0,0125 a 0,2 mg/mL. Obteve-se uma concentração de bixina no extrato de 0,079 mg/mL, sendo que este apresentou uma taxa de bixina de aproximadamente 18% p/v da substância (APARNATHI, 1997; CARVALHO, 1993; YABIKU, 1992).

Animais

Foram utilizados 16 ratos Wistar saudáveis, sendo 8 machos e 8 fêmeas, sexualmente maduros. Esses animais foram distribuídos randomicamente em quatro grupos, sendo um controle (macho e fêmea) e um tratado (macho e fêmea). O peso médio inicial das fêmeas foi de $224,75 \pm 23,48$ gramas e de $404,24 \pm 32,15$ gramas para os machos.

Os animais foram armazenados no biotério do ICB-2 da UFG e alimentados segundo as normas de alimentação de animais de laboratório (NRC, 1978). Foi oferecida ração padrão para animais de laboratório e água *ad libitum*.

Tratamento

Os animais receberam diariamente durante um período de 21 dias, sempre pela manhã, uma administração oral através da técnica de gavagem (WAYNFORTH, 1980), de uma dose D10 (10 mg/Kg) de extrato bruto de Urucum para os grupos tratados, que corresponde a dez vezes a ingesta normal aceitável de bixina (1,0 mg/Kg) (FOA, 1975), e administração de salina nos grupos controle. A substância de teste foi administrada na proporção de 1ml/25mg de peso corporal.

Pesagem dos Animais

Os animais foram pesados semanalmente, sendo que duas pesagens ocorreram antes do início do tratamen-

to (basal) e quatro pesagens após, ocorrendo nos mesmos dias das coletas de sangue dos animais.

Coleta de Amostras de sangue para análise

Os animais foram submetidos à coleta de sangue através da técnica de coleta retro orbital com microcapilares heparinizados (WAYNFORTH, 1980 e KRAUS, 1980). Foram realizadas um total de seis coletas, sendo que as duas primeiras ocorreram antes do tratamento (basais). As coletas ocorreram com intervalos de sete dias, sendo que volume coletado em cada seção foi de aproximadamente 0,5 ml. O sangue heparinado coletado, foi imediatamente submetido a separação em microcentrífuga refrigerada a 5°C, a 11.000 rpm durante 10 minutos. O plasma obtido foi acondicionado em tubos de vidro e armazenados sob refrigeração e encaminhado ao laboratório de bioquímica.

Dosagens Bioquímicas

Foram realizadas dosagens plasmáticas de colesterol total, triglicérides e glicose no mesmo dia da coleta. Foi utilizado o equipamento Vitalab Selectra II, da marca Merck, multicanal, totalmente automatizado com uso de kits bioquímicos da marca Doles Reagentes, de acordo com as metodologias enzimáticas baseadas no princípio colorimétrico, segundo a lei de Beer.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados, sendo que foi usado o teste t ou de "Student" (VIEIRA, 1980), para comparar os grupos controle e tratados para as variáveis, peso, glicose, triglicérides e colesterol total.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas 6 coletas, sendo, a 1ª e a 2ª consideradas basais, as quais não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Os níveis plasmáticos de glicose das fêmeas não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), ao contrário da diminuição significativa ($p > 0,05$) dos níveis glicêmicos ocorrida para os machos na 5ª e 6ª coleta, o que assemelha-se a diminuição de glicose citado por MARTINS *et al.* (1997) em coelhos. Uma redução significativa ($p < 0,05$) dos níveis plasmáticos de triglicérides semelhante a relatada por RUSSI *et al.* (1997) em coelhos, não foi observada, tanto em fêmeas como em machos. Estas divergências nos resultados obtidos talvez possam decorrer do fato de ter sido utilizado outra espécie animal, ratos Wistar, podendo esta ser menos sensível a variação plasmática de triglicérides e glicose quando submetidas ao tratamento com extrato bruto de urucum.

Foi verificada uma diminuição significativa ($p > 0,05$) pelo tratamento com extrato bruto de urucum nos níveis plasmáticos de colesterol total, sendo semelhantes aos relatados por CHAVES *et al.* (1997) em humanos. A redução de colesterol total do grupo tratado em relação ao grupo controle foi mais evidente para os machos, nos quais esta diminuição ocorreu a partir da 5ª coleta. Para as fêmeas, a redução do colesterol total foi significativa ($p < 0,05$) apenas quando analisou-se as quatro coletas juntas, uma análise das coletas de forma individual não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) para os níveis de colesterol total. Estes resultados sugerem um efeito do extrato bruto de urucum no comportamento metabólico do colesterol nas duas situações experimentais, além de uma relação entre os níveis plasmáticos e o tempo de uso do extrato bruto de urucum.

Durante o período de tratamento não foi observada nenhuma variação significativa ($p > 0,05$) do peso corporal entre grupo controle e grupo tratado.

Este estudo sugere a presença de um princípio ativo no extrato bruto de urucum (*Bixa orellana* L.) capaz de reduzir as taxas plasmáticas de colesterol total para machos e fêmeas, além de diminuir os níveis plasmáticos de glicose nos machos. Entretanto, este princípio ativo não foi eficaz na redução dos níveis plasmáticos de glicose nas fêmeas e triglicérides nos machos e nas fêmeas. Isto fica evidenciado pela diferente correlação entre colesterol e triglicérides, que no grupo controle foi de 55% ($p < 0,0001$) e nos grupos tratados 35% ($p < 0,01$).

Estudos posteriores são necessários para demonstrar os mecanismos que levam a esta redução de colesterol total plasmático, o que poderá ser facilitado com a purificação deste extrato. No entanto deve-se ressaltar a necessidade de uma avaliação dos possíveis efeitos colaterais causados pelo uso do extrato bruto de urucum.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a valiosa colaboração dos professores Elson A. Costa e Eliane S. Seraphin e das empresas Doles Reagentes e Biocenter Laboratório Clínico pelo apoio técnico na realização deste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

- APARNATHI, K.D.; BINDAL, M.P. Rapid method for estimation of bixin in annatto seeds. *Indian Journal of Dairy Science*, v. 50, n. 4, p.285-289, 1997.
- BERMUDEZ, J.A. *Indústria farmacêutica, Estado e sociedade*. Hucitec-Sobravime, São Paulo, 1995.
- CARVALHO, P.R.; SILVA, M.G.; MOREIRA, C.G. Evaluation of spectrophotometric methods for the analysis of annatto seeds (*Bixa orellana*). *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 2, p.181-188, 1993.
- CHAVES, H.L.; BARROS, R.M.F.; MICENO, A.M.; ÁVALOS, A.H. Avaliação da Influência do Extrato Bruto do urucum (*Bixa orellana* L.) nas taxas plasmáticas das hipoproteínas HDL e LDL em humanos hipercolesterolêmicos. *Anais do VI Encontro De Iniciação Científica*. Módulo UFG-UFU-UCG-UCOB-UFMS. Goiânia, p.140. 1997.
- CUNHA, L.G.C.; FREIRE, J. M.; FARIAS, E. Diagnostico da cultura do urucum (*bixa orellana*) na Ibiapaba. Fortaleza. *Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará*, p.37, 1973.
- FAO/WHO – CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Codex committee on food additives, Potential Daily Intake of food additives. *The Hague*, 2-7 jun 1975.
- FUKUDA, R.; DENADAI, S.M.S.; BARROS, R.M.F. Estudo químico da semente do Urucum (*Bixa orellana*) e sua aplicação farmacológica. *Anais da 2ª Reunião Especial Da SBPC*, Cuiabá. UFMT/SBPC., p. 273, 1995.
- HART, G. Bixin content *bixa orellana* in Papua and New Guinea. *Papua and New Guinea Agric. J.*, v.17, n.1, p.8-11. 1964.
- INGRAM, J.S. & FRANCIS, B.J. The annatto tree (*L. Bixa orellana*). A guide to its occurrence, cultivation, preparation and uses. *Trop. Sci.*, v.11, n.2, p-97-102. 1969.
- KRAUS, A.L. Research methodology. In: *The Laboratory Rat Research Applications*. H.J. BAKER, J.R. LINDSEY, S.H. WEISBROTH. Academic Press, New York: v.2. p.1-4. 1980.
- LEITE, L.O.; MARTINS, M.; DENADAI, S.M. Isolamento de bixina na forma de cristais. *Anais do V Encontro de iniciação científica da UCG*. Goiânia, Ed. UCG, p.25, 1996.
- MARTINS, M.; RUSSI, T.S.; BARROS, R.M.F.; DENADAI, S.M.S.; AVEIROS, D.M. Efeitos histológicos e glicêmicos do uso da infusão da semente de urucum (*Bixa orellana* L.) em coelhos hiperlipidêmicos. *Anais do VI Encontro De Iniciação Científica*. Módulo UFG-UFU-UCG-UCOB-UFMS. Goiânia, p.138. 1997.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.). *Nutrient requirements of laboratory animals*. 3º Revised Ed., Washington: National Academy of Sciences, 1978.
- RELATÓRIO COMISSÃO PARLAMENTAR DE INQUÉRITO – CPI DOS MEDICAMENTOS. Relatório final dos trabalhos. Câmara Deputados, Brasília, 2000.
- RESOLUÇÃO DO 3º CONGRESSO DA FEDERAÇÃO NACIONAL DOS FARMACÊUTICOS. Política nacional de Assistência Farmacêutica inserida numa política de saúde. Rio de Janeiro, 2000.
- RUSSI, T.S.; MARTINS, M.; BARROS, R.M.F.; DENADAI, S.M.S.; AVEIROS, D.M. Efeitos histológicos de colesterol e triglicérides plasmáticos da influência da semente de urucum (*Bixa orellana* L.) em coelhos hiperlipidêmicos. *Anais do VI Encontro De Iniciação Científica*. Módulo UFG-UFU-UCG-UCOB-UFMS. Goiânia, p.137-138, 1997.
- SANTOS, E. ; O Urucu. Serviço de informações agrícolas. Ministério da agricultura. Rio de Janeiro, p.13, 1958.
- SCHENKEL, E.P. *Cuidado com os medicamentos*. 1ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/UFSC, 1996.
- SRINIVASULU, C; MAHAPATRA, SN. A process for the isolation of bixin. *Research and Industry*, v.34, n.2, p.137-138, 1989.
- VIEIRA, S. *Introdução a Bioestatística*. 3ª ed., Rio de Janeiro: Campus, 1980.
- WAYNFORTH, H.B. Experimental and surgical technique in the rat. *Academic Press*, London UK, v.84. 1980.
- YABIKU, H.Y; TAKAHASHI, M.Y. Determination of bixin in annatto seeds: a collaborative study. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 52, n.1-2, p. 31-36, 1992.