



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS

Lucécia Fátima Souza

**AÇÃO ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS
DO URUCUM - BIXINA**

Porto Alegre

2011

Lucécia Fátima Souza

**AÇÃO ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS
DO URUCUM - BIXINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Erna Vogt de Jong
Co-orientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios

PORTO ALEGRE

2011

Lucécia Fátima Souza
(Bacharel em Nutrição pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos –
UNISINOS)

**DISSERTAÇÃO:
AÇÃO ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS
DO URUCUM - BIXINA**

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:..... /..... /.....

Pela Comissão Examinadora:

Homologada em:...../...../.....

Prof.^a Dr.^a. Erna Vogt de Jong
Orientador – Dr.^a em Ciência da Nutrição
PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. José Maria Wiest
Coordenador do Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos (PPGCTA)

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Co-orientador –Dr. em Ciência dos Alimentos
ICTA/UFRGS

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz
Dr. em Sciences Alimentaires
PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Vitor Mafroi
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos. ICTA/UFRGS

Paula Cilene Santos
Prof.^a. Dr.^a em Ciências Biológicas
Centro Metodista Universitario (IPA)
Dr.^a Ciências Biológicas

Prof.^a. Graciela Cristina dos Santos
Dr.^a em Ciências Nutricionais
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

PORTO ALEGRE

2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, em especial minha mãe, que apesar de não saber a magnitude de estudar, sente orgulho de mim.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Erna Vogt de Jong, por todo o apoio no desenvolvimento deste trabalho e por ter me dado o privilégio de fazer parte da sua vida. Agradeço a ela toda a paciência, os aprendizados, o incentivo, a compreensão, a amizade e principalmente todo o carinho.

Ao meu co-orientador Alessandro de Oliveira Rios, pela paciência, pelos ensinamentos e por estar sempre disposto a ajudar todas as vezes que precisei. Além da amizade sincera que foi um grande presente para mim.

A Marina, amiga que tanto admiro obrigada pelo companheirismo em todas as horas, maninha que me deixa muito orgulhosa e que jamais vou esquecer. A Lívia, Daiane, Niara, Carlos, Cleice, Roberval, que muito trabalharam para a concretização deste trabalho.

A Doutora Paula Cilene por toda ajuda na realização da histologia deste trabalho.

A Tâmmila, Rosinha, Priscilla, Marina, Alessandro e todas as gurias do laboratório, pelas reuniões muito produtivas e inesquecíveis que tivemos nestes dois anos de mestrado.

Ao meu grande amigo e namorado Daniel que sempre acredita e me incentiva na busca dos meus objetivos.

A toda equipe do Restaurante Bom Dia, minha segunda família, pela compreensão e força que sempre me deram na busca da minha realização.

E a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

RESUMO

O urucum (*Bixa Orellana L.*), planta arbustiva da família *Bixaceae*, é uma cultura que vem conquistando cada vez mais importância econômica, uma vez que do pericarpo da semente se extrai um corante natural, constituído por carotenóides, com predominância da bixina. A presença na dieta de compostos como os carotenóides podem contribuir para minimizar os efeitos dos radicais livres produzidos no organismo. Alguns quimioterápicos como a cisplatina, produzem efeitos colaterais indesejáveis aos pacientes em tratamento, proporcionando queda nos níveis de antioxidantes séricos e aumento na atividade dos radicais livres que podem refletir na falência renal e hepática. A presença na dieta de compostos como os carotenóides podem contribuir para minimizar tais efeitos. Neste sentido, torna-se de grande importância à investigação dos efeitos benéficos de tais pigmentos frente ao estresse oxidativo, sendo o estudo com animais de laboratório uma opção viável. O presente trabalho avaliou a composição centesimal, a quantidade de bixina presente e ação terapêutica da semente de urucum e dos cristais de bixina na redução da toxicidade da cisplatina sobre as desordens renais e hepáticas em ratos adultos, da linhagem *wistar*, machos. Os animais receberam o pré-tratamento com bixina (0,065 mg/kg de peso) e urucum (0,500mg/kg de peso) durante 28 dias, com controle de peso a cada dois dias, para ajustar as doses dos carotenóides utilizados. A cisplatina foi administrada intraperitonealmente (5mg/kg de peso) 48 horas antes do término do experimento. Após abate, o sangue foi coletado na artéria aorta ascendente e foram retirados o fígado para a extração da gordura, dosagens enzimáticas e índice de peroxidação lipídica e os rins para análise histológica. O resultado da composição centesimal mostrou que as sementes de urucum apresentaram características nutricionais desejáveis, com alto teor de proteínas e fibras. Os resultados das análises hepáticas mostraram que a aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), uréia e creatinina apresentaram reduções significativas nos grupos que receberam o pré-tratamento com bixina e urucum. A cisplatina causou aumento da deposição de gordura hepática e da peroxidação lipídica. Na análise histológica observou-se que os animais do grupo cisplatina sem a presença de urucum ou bixina apresentaram alterações inflamatórias, caracterizadas por modificações glomerulares e aumento no número de polimorfonucleares (PMN). Os resultados deste estudo mostraram que houve proteção hepática e renal contra a injúria causada pela cisplatina, quando administrado o urucum ou a bixina na dieta dos animais, antes da injeção deste fármaco.

Palavras-chaves: Bixina, urucum, cisplatina, desordens hepáticas e renais.

ABSTRACT

The annatto (*Bixa orellana L.*) is a Bixaceae family bushy plant, being a cultivation with a growing economic relevancy since that from seed's pericarp can be extracted a natural colorant with carotenoid constitution and bixin predominance. The presence of compounds like the carotenoids can cooperate to minimize the free radicals effects produced at the organism. Some chemotherapeutic agents as cisplatin can produce unwanted side effects to the patients under treatment, providing serum antioxidants levels decrease and free radicals activity increase, that may imply in hepatic and renal collapse. The presence of compounds like the carotenoids, in diet, can minimize such effects. For such reasons, the investigation of the benefits of these pigments takes great relevancy against the oxidant stress, while the analysis through laboratory animals was a viable option. This study evaluated the centesimal composition, the bixin quantity presence and the therapeutic action of annatto's seed and bixin crystals at cisplatin toxicity decrease on renal and hepatic disorders in *wistar* male rats. The animals received the pretreatment with bixin (0,065 mg/kg) and annatto (0,500 mg/kg) along twenty eight days, with weight control every two days to order of carotenoid dosage adjust. The cisplatin was intraperitoneally injected (5 mg/kg) forty four hours before the experiment ending. After animal euthanasia , the blood was collected in ascending aorta and the liver was removed to order of fat extraction, enzymatic dosages and lipid peroxidation tax. Also, the kidnyes was remover to to histological analysis. The centesimal composition results showed that annatto's seeds featured wanted nutritional traces with high protein and fiber content. The hepatic analysis results demonstrated that aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea and creatinine levels decreased significantly in the groups receiving pretreatment with bixin and annatto. The cisplatin caused increased deposition of hepatic fat and lipid peroxidation. In the histological analysis was noticed that the animals which was given the cisplatin without annatto or bixin presence were found inflammatory alterations, characterized by glomerular changes and increased number of polymorphonuclear (PMN). The results of this study show a hepatic and renal protection against the injury caused by cisplatin, when applying annatto and bixin in the animals' diet before injecting this drug.

Keywords: Bixin, annatto, cisplatin, hepatic and renal disorders.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1: TOXICIDADES ASSOCIADAS AO TRATAMENTO COM CISPLATINA.	15
FIGURA 2: ESTRUTURA BÁSICA DOS CAROTENÓIDES.	20
FIGURA 3: FRUTOS E SEMENTES NO INTERIOR DAS CACHOPAS (PLANTAMED).....	24
FIGURA 4: SEMENTE DE URUCUM	24
FIGURA 5: COLORAU.....	25
FIGURA 6: ESTRUTURA DA BIXINA E DA NORBIXINA.	26

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABELA 1: COMPOSIÇÃO QUÍMICA (%) 48

TABELA 2: MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DO GANHO DE PESO (GP), CONSUMO ALIMENTAR (CA) E COEFICIENTE DE EFICIÊNCIA ALIMENTAR (CEA) DE RATOS ADULTOS DURANTE 28 DIAS E SEUS RESPECTIVOS TRATAMENTOS..... 48

TABELA 3: MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DO PERFIL DOS RESULTADOS DO PESO E GORDURA DO FÍGADO E DO COLESTEROL DE RATOS ADULTOS DURANTE 28 DIAS E SEUS RESPECTIVOS TRATAMENTOS..... 48

TABELA 5: MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DOS RESULTADOS DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS HEPÁTICAS ASPARTATO AMINOTRASFERASE (AST) E ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) APÓS 48 H DA ADMINISTRAÇÃO DE CISPLATINA.....48

ARTIGO 2

TABELA 1: MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA CONTAGEM DO DIFERENCIAL DE CÉLULAS SANGUÍNEAS EM RATOS WISTAR..... 62

ARTIGO 3

TABELA 1: MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA RELAÇÃO PESO CORPORAL FINAL COM PESO RENAL DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS A DIFERENTES TRATAMENTOS 77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 RADICAIS LIVRES	12
2.2 CISPLATINA	14
2.3 PIGMENTOS NATURAIS-CAROTENÓIDES	17
2.4 AÇÃO ANTIOXIDANTE DOS CAROTENÓIDES.....	21
2.5 URUCUM	23
2.6 BIXINA.....	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	30
ARTIGO 1 - ANNATTO SEEDS' ANTIOXIDANTS AS A POSSIBLE INHIBITING AGENT OF HEPATOTOXICITY INDUCED BY CISPLATIN ANTITUMOUR.....	30
ARTIGO 2 - BIXIN CAROTENOID AND ANNATTO SEEDS EFFECTS OVER HEMATOLOGIC PARAMETERS OF RATS UNDER CISPLATIN TREATMENT	30
ARTIGO 3-ANNATTO SEEDS' ANTIOXIDANTS AS A POSSIBLE INHIBITING AGENT OF HEPATOTOXICITY INDUCED BY CISPLATIN ANTITUMOUR..	310
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos tem crescido nos últimos anos, e, durante a observação de um alimento qualquer, fica claro que o impacto visual causado pela cor sobrepõe-se aos demais. Este atributo é um dos mais importantes na comercialização dos alimentos e constitui critério de aceitação ou não do produto. A rejeição aos corantes sintéticos por motivos de saúde faz crescer a busca por corantes naturais que possam substituí-los adequadamente.

Dentre os corantes naturais, o urucum é o mais usado pela indústria brasileira, representando cerca de 90% dos corantes naturais usados no Brasil e 70% no mundo. As preparações de urucum são usadas para colorir manteiga, queijos, produtos de panificação, óleos, sorvetes, cereais e embutidos (MERCADANTE, 2001).

O urucum (*Bixa Orellana L.*) é o único gênero pertencente à família Bixaceae, sendo uma árvore nativa das florestas chuvosas da América Tropical. O fruto possui características raras, como a obtenção de extratos hidrossolúveis ou lipossolúveis a partir das sementes e a estabilidade, conferida por sua propriedade de se ligar a determinadas proteínas, faz do urucum um dos principais corantes naturais para alimentos (CONTO et al., 1991).

Do total de sementes de urucum produzido no Brasil, cerca de 25% são utilizados na preparação de extratos lipo e hidrossolúveis e o restante é usado na fabricação do colorífico, totalmente consumido no mercado interno. Este produto, com amplo uso doméstico, proporciona cor avermelhada ao arroz, risotos, bifés, frangos, farofas, molhos e queijos. Seu principal mercado é a região Nordeste do país.

O principal pigmento encontrado no urucum é a bixina, de coloração vermelho-amarelada, que representa cerca de 80% de todos os carotenóides presentes na semente. A bixina é solúvel em óleo e é o único carotenóide

natural que possui dois grupos carboxílicos (MERCADANTE et al., 1998), sendo o mais efetivo supressor biológico de oxigênio singlete. Este composto pode contribuir para a proteção de células e tecidos contra os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio e de radicais livres além de possuir efeito hipocolesterolemizante (DI MASCIO et al., 1990).

Drogas antineoplásicas, como a cisplatina, produzem alguns efeitos colaterais indesejáveis aos pacientes em tratamento, proporcionando queda nos níveis de antioxidantes séricos, que podem refletir na falência do mecanismo de defesa contra a lesão oxidativa.

A presença na dieta de compostos como os carotenóides podem contribuir para minimizar tais efeitos e propiciar melhor recuperação do paciente. Neste sentido, torna-se de grande importância à investigação dos efeitos benéficos de tais pigmentos frente ao estresse oxidativo, sendo o estudo com animais de laboratório uma opção viável.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a possível ação terapêutica da semente de urucum e dos cristais de bixina, na redução da toxicidade da cisplatina sobre as desordens hepáticas e renais em ratos Wistar machos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RADICAIS LIVRES

Moléculas orgânicas, inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres. Essa configuração os tornam moléculas altamente instáveis, com tempo de meia-vida muito curto e quimicamente reativas (ANTUNES et al., 2004).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídios, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação.

Os radicais livres são citotóxicos às células do endotélio vascular e reduzem a disponibilidade do óxido nítrico (NO) favorecendo a ocorrência de vasoconstrição, trombose e inflamações. O NO vem recebendo destaque por possuir importante papel em uma ampla variedade de processos fisiológicos, uma vez que apresenta ação vasodilatadora, transmite sinais nos sistemas nervoso periférico e central, participa das respostas citotóxicas e citostáticas do sistema imune, inibe a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), a produção de endotelina, a agregação e a adesão de plaquetas (DA LUZ; COIMBRA, 2004; ENGLER; ENGLER, 2004; GELETTI et al., 2002).

Ao contrário dos efeitos apresentados pelo NO, a endotelina-1 (ET-1) é uma substância que promove a adesão de leucócitos, induz a quimotaxia dos monócitos e a proliferação das células do músculo liso, de forma que o LDL chegue às células endoteliais. Tal composto é considerado um potente peptídeo vasoconstritor, que está relacionado com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e aterosclerose. Experimentos demonstraram que substâncias antagônicas à ET-1, previnem a manifestação dos primeiros estágios da aterosclerose, como disfunção endotelial, além de reduzir os infartos do miocárdio. Estudos evidenciaram que pacientes com doença coronariana possuem alta produção de endotelina. Por isto, esta doença é

utilizada como um marcador da extensão da aterosclerose em humanos (CORDER et al., 2001; DA LUZ, COIMBRA, 2004).

Entre as principais formas reativas de oxigênio, o ânion superóxido (O_2^-) apresenta baixa capacidade de oxidação e o radical hidroxila (OH^-) mostra pequena capacidade de difusão, sendo, contudo o mais reativo na indução de lesões nas paredes celulares.

Existem, entretanto, compostos igualmente reativos quanto os radicais livres que não possuem elétrons não pareados na última camada, sendo denominados de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou espécies reativas de nitrogênio (RNS). Nestes grupos estão incluídos o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o cátion nitrosonium (NO^+), o ânion nitroxila (NO^-) e o peróxinitrito ($ONOO^-$) (BIANCHI, ANTUNES, 1999).

O desequilíbrio entre a produção de ROS/RNS e a remoção pelos sistemas de defesa antioxidante é denominado estresse oxidativo. Esta condição celular ou fisiológica é caracterizada pela elevada concentração de ROS/RNS e causa danos moleculares às estruturas celulares, com conseqüente alteração funcional e prejuízos às funções vitais, em diversos tecidos e órgãos, tais como músculo, fígado, tecido adiposo e cerebral. No entanto, o efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente de um ser vivo para outro, de acordo com idade, estado fisiológico e dieta (ZOPP, CASTANHO, MACEDO, 2003).

A formação de radicais livres ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons, que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. Nas últimas décadas, evidências experimentais indicam que os metabólitos reativos de oxigênio, são importantes mediadores de danos em diversos tecidos e órgãos, inclusive o rim. As espécies reativas de oxigênio têm sido implicadas no dano glomerular, na falha renal aguda e nas doenças tubulares (ROBBINS, 2002). Estas alterações renais podem ser provocadas pelas ROS, resultantes do estresse oxidativo crônico (ANTUNES, 2004).

Estes radicais podem ser gerados no citoplasma, na mitocôndria ou no núcleo das células. A concentração intracelular de radicais livres pode ser

aumentada pela maior geração desses radicais ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes. A aceitação de que os radicais livres são responsáveis pela indução de várias patologias renais está apoiada em duas linhas de evidências experimentais: pela detecção de produtos resultantes dos danos oxidativos nos tecidos renais e na urina ou pela demonstração experimental dos efeitos protetores de agentes que inibem a geração de radicais livres nos rins (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Pesquisas tem relacionado a injúria renal com a produção excessiva de radicais livres, que são podem ser gerados com o uso de quimioterápicos. A cisplatina é uma droga utilizada no tratamento de vários tumores, sendo a nefrotoxicidade um dos efeitos colaterais, causada pelo acúmulo de platina nos rins (ANTUNES et al, 2004).

2.2 CISPLATINA

A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina II) é um complexo de platina efetivo na quimioterapia quando administrada por via intraperitoneal ou intravenosa (ROSENBERG E VANCAMP, 1970). Foi introduzida na área clínica em 1971, sendo os complexos coordenados de platina uma nova classe de potentes agentes antineoplásicos (SANTOS, 2008).

Quimicamente, a cisplatina possui um átomo central de platina envolto por dois átomos de cloro e dois grupos amônia. Torna-se ativada dentro da célula por substituição dos íons cloreto por moléculas de água e esta forma é muito reativa nos centros nucleofílicos de biomoléculas como DNA, RNA, proteínas e membranas fosfolipídicas (CHO et al., 2008; WANG e LIPPARD, 2005; JAMIESON, LIPPARD, 1999). A cisplatina pode existir nas formas cis e trans, mas somente a configuração cis é efetiva. O isômero trans não tem bioatividade significativa.

Este fármaco, cuja atividade biológica foi descoberta por ROSENBERG e VANCAMP et al. em 1965, tem apresentado potencial terapêutico em grande variedade de neoplasias humanas. É um dos agentes citoredutores mais

eficazes no tratamento de vários tumores, sendo particularmente eficaz no tratamento dos tumores do testículo, ovário, cabeça, pescoço, melanomas malignos, carcinomas da bexiga e do pulmão (SANTOS, 2008).

No entanto o uso da cisplatina é limitado devido aos seus efeitos adversos como nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade, mielossupressão, efeitos gastrintestinais e mutagênese (WEIJL; CLETON; OSANTO, 1998).

Para a cisplatina, a dose máxima tolerada está entre 100 e 120 mg/m² (I.V.) ou entre 2,5 e 3,0 mg/kg (I.V.) por ciclo e deve ser administrada com pré- e pós-hidratação adequada (HARTMANN; LIPP, 2003; MARKMAN, 2003). A concentração normalmente encontrada no plasma de pacientes tratados com cisplatina é de 35 mM (DIMANCHE-BOITREL et al., 2005). Entretanto, overdoses acidentais de cisplatina podem ocorrer. Embora a reação à quimioterapia seja diferente de paciente para paciente, quase todos os indivíduos que são tratados com cisplatina apresentam problemas gastrintestinais.

A Figura 1 resume os principais efeitos colaterais tóxicos da cisplatina.

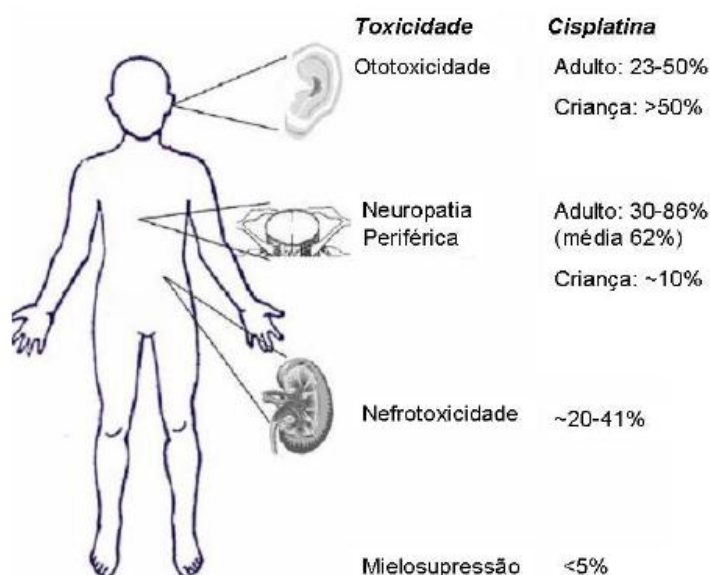


Figura 1: Toxicidades associadas ao tratamento com cisplatina.
Fonte: Rabik, Dolan (2007).

Segundo Behling (2004) metais pesados, em geral, e a platina em particular, são nefrotóxicos, sendo seu uso, muitas vezes, acompanhado por lesão morfológica ou funcional nos rins. É provável que a causa direta mais comum de Insuficiência Renal Aguda (IRA) em pacientes com câncer, seja a administração da cisplatina. Esta toxicidade orgânica é a que mais interfere com a vida normal dos pacientes, uma vez curados de sua neoplasia maligna (APPENROTH et al., 1990).

A nefrotoxicidade aguda ou crônica causada pelo fármaco é, geralmente, o efeito colateral limitante de seu uso (DE CONTI, 1973). Tal efeito colateral é caracterizado pela redução da função mitocondrial (GORDON; GATTONE, 1986), diminuição da atividade da ATPase (UOZOMI; LITTERST, 1985), alteração do conteúdo de cátion na célula, transporte alterado de soluto, persistente perda de sódio, magnésio, potássio, cálcio, água; diminuição do fluxo sanguíneo renal; diminuição da taxa de filtração glomerular, aumento da creatinina sérica e aumento do nitrogênio uréico do sangue (SEGURO et al., 1989; BARROS et al., 1989).

Como resultado, não somente as células tumorais do paciente irão sofrer, mas também os tecidos normais serão gravemente afetados durante a quimioterapia. A toxicidade pode-se estabelecer através da geração de radicais livres (BALIGA et al; 1998).

A utilização da cisplatina proporciona queda nos níveis de antioxidantes séricos, que podem refletir falência do mecanismo de defesa contra a lesão oxidativa induzida por drogas antineoplásicas (WEIJL et al., 1998).

Usando cisplatina em dose única intraperitoneal em ratos, foi verificado que ocorreram acentuadas alterações morfológicas, seletivamente no segmento S3 (último segmento da parte reta) do túbulo proximal, situado na medula externa (McCLAY; HOWELL, 1990). Neste modelo, os glomérulos, túbulos distais e coletores, ou estão normais, ou levemente alterados. Esta lesão evidencia-se em torno de 3 dias do uso do fármaco. A perda de microvilosidades, tumefação celular e necrose são as alterações descritas nesta fase. A regeneração se inicia após 7 dias (JONES et al., 1985).

Uma abordagem alternativa para proteger dos efeitos colaterais da

cisplatina é o uso de antioxidantes provenientes da dieta. Alguns estudos têm sido realizados para diminuir a peroxidação lipídica e os efeitos citotóxicos induzidos pela cisplatina, como o emprego de antioxidantes provenientes da dieta, tais como os carotenóides selenito de sódio, vitaminas C e E, curcumina e o carotenóide bixina (SILVA et al; 2001).

Em relação aos corantes naturais de alimentos, poucos trabalhos avaliaram sua proteção contra os efeitos adversos causados pela cisplatina. Sendão (2006) investigou o efeito mutagênico de diferentes doses do carotenóide licopeno e o seu possível efeito protetor sobre as aberrações cromossômicas induzidas pela cisplatina. O trabalho mostrou que o licopeno em todas as doses testadas, não reduziu os valores do índice mitótico e não aumentou o total de aberrações cromossômicas, quando comparados com o controle negativo e solvente. Os animais tratados de forma aguda e subaguda com diferentes doses do licopeno e com o antitumoral mostraram uma redução significativa no total de aberrações cromossômicas e no número de metáfases com aberrações cromossômicas.

Estes dados promissores podem servir de subsídios para futuras pesquisas envolvendo carotenóides em estudos clínicos de quimioprevenção.

2.3 PIGMENTOS NATURAIS-CAROTENÓIDES

Os carotenóides compreendem uma família de compostos naturais, dos quais mais de 600 variantes estruturais estão relatadas e caracterizadas. Tais compostos podem ser encontrados em bactérias, algas, fungos e plantas superiores. A produção natural mundial é estimada em 100 milhões de toneladas por ano, e é encabeçada pela fucoxantina produzida por algas fotossintéticas marrons (FONTANA et al., 2010).

Os mamíferos não estão bioquimicamente capacitados para a biossíntese de carotenóides, tendo que desta forma os adquirir através da dieta. No plasma humano predominam o β -caroteno e o licopeno. Os carotenóides mais comumente encontrados nos alimentos vegetais são o β -

caroteno (cenoura), licopeno (tomate), várias xantofilas como a zeaxantina e a luteína (manga, mamão), e a bixina (aditivo culinário e corante dérmico usado por indígenas amazônicos, obtida do urucum (*Bixa Orellana L.*). Outros compostos, pertencentes a esta classe e de ocorrências naturais são a capsaxantina e capsorubina (páprica, *Capsicum annum*) e a crocina (açafão, *Crocus sativus*) (CURVELO, 2006).

Existe uma grande variedade de fontes de carotenóides disponíveis na imensa gama de frutas e verduras produzidas em todo o Brasil, mas também estão presentes em leite e derivados, gema de ovos, alguns peixes e crustáceos e em alimentos aos quais foram adicionados como corantes naturais (RIOS et al., 2004).

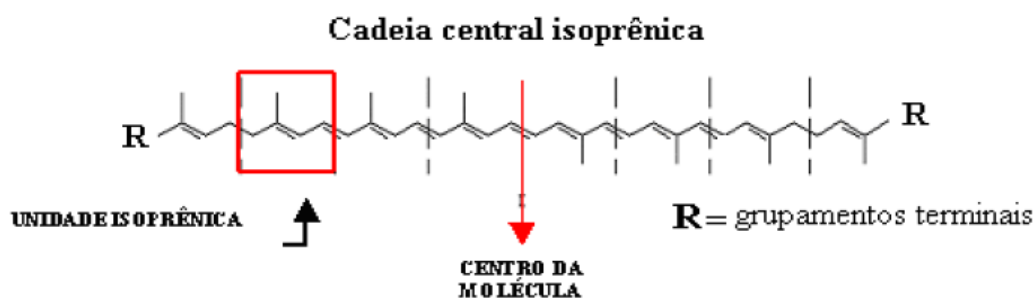
A partir de 1999, a legislação brasileira liberou o uso de corantes em massas alimentícias, exceto nas massas com vegetais. Até então só era permitida a adição de β -caroteno em massas com ovos, devido às suas características nutricionais,. Atualmente, os dois tipos de corantes permitidos são: o β -caroteno sintético, obtido por síntese química em laboratório e classificado como corante sintético idêntico ao natural e os naturais carotenóides vegetais, à base de urucum, que podem ser comercializados puros ou em mistura com β -caroteno e vitamina A. Tais pigmentos registraram grande expansão no seu emprego em massas, sendo hoje predominantes, por serem naturais, inócuos, atóxicos e pela qualidade de sua cor, apesar de seu custo ser superior ao dos sintéticos (OLIVEIRA, 2005).

O colorau é definido pela resolução CNNPA 12/78 do Ministério da Saúde como um produto constituído pela mistura de fubá ou farinha de mandioca com urucum em pó ou extrato oleoso de urucum, adicionado ou não de sal e de óleos comestíveis (BRASIL, 1999).

Os carotenóides não são apenas outro grupo de pigmentos naturais, pois apresentam propriedades funcionais que formam a base de diversas funções e ações nos organismos vivos. Alguns carotenóides apresentam importante função nutricional na dieta de humanos como precursores de vitamina A, além de outras ações benéficas como proteção contra certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, degeneração celular e fortalecimento do sistema imunológico (KRINSKY, 1994).

Suas funções estão relacionadas, principalmente devido a sua estrutura química, caracterizados pela presença de uma longa cadeia poliênica conjugada. As variações estruturais ocorrem na extremidade da cadeia, podendo apresentar anéis ou terminação poliênica. Na Figura 2 são apresentadas a estrutura central poliênica, a seqüência de unidades terpenóides e algumas das mais comuns terminações de cadeia encontradas nos diversos carotenóides (SCHWARTZ , 2010).

Os carotenóides são usualmente tetraterpenóides C40 constituídos de oito unidades isoprenóides, C5, unidas. A estrutura linear básica é simétrica e pode apresentar-se com uma ou ambas as extremidades cíclicas. Nestes compostos, as unidades de isopreno, apresentam no meio da molécula, nas posições 1:6, dois grupamentos metílicos, enquanto todos os outros grupos metílicos da cadeia lateral ocupam a posição 1:5. Reações de ciclização e outras modificações, tais como: hidrogenação, desidrogenação, migração da dupla ligação, redução ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de função oxigenada ou combinação destes processos dão origem a um extenso número de estruturas. Suas distintas características devem-se a presença das ligações duplas conjugadas na cadeia, que servem como cromóforos absorvedores de luz e que, atribuem a estes compostos cores que variam do amarelo ao vermelho (RODRIGUEZ et al., 2001).



Grupamentos terminais de alguns carotenóides

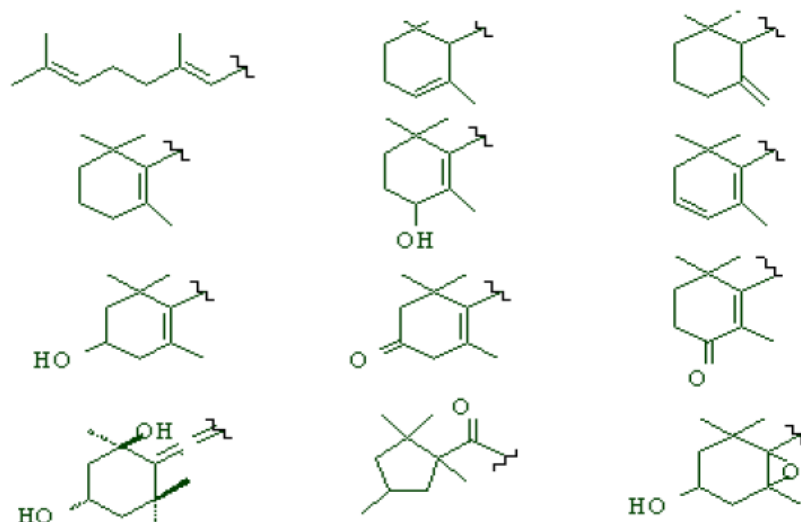


Figura 2: Estrutura básica dos carotenóides.
Fonte: Schwartz (2010).

Devido a sua estrutura, os carotenóides podem sofrer isomerização geométrica e oxidação, acarretando perda do poder corante e perda/diminuição de atividade antioxidante. Contudo, a oxidação ou hidrólise da cadeia de carotenóides ocorre em condições extremas de temperatura, presença de enzimas ou oxigênio singlete, de radicais livres ou alta concentração de oxigênio (RIOS, 2004).

A presença de carotenóides nas plantas sempre despertou a atenção de pesquisadores. Karrer e Jucker (1950) destacaram a existência de muitos estudos, entre estes a possível associação dos carotenóides com os mecanismos de respiração das plantas. As pesquisas mostravam constante proporção entre os carotenóides (caroteno e xantofila) e a clorofila nas folhas das plantas, sugerindo que estes atuavam como filtro para a clorofila.

Nas plantas, os carotenóides funcionam como pigmentos absorvedores

de luz, transferindo esta energia para a clorofila no mecanismo da fotossíntese. Os carotenóides também agem como filtros de radiação ultravioleta, protegendo as plantas da foto-oxidação, prevenindo as células de danos provocados pelo oxigênio singlete. Ainda, em situações de estresse, ferimentos ou severa exposição à luz pelas plantas, estes compostos atuam na proteção contra futuras infecções ou danos oxidativos (CHAUDHRY, 2003).

2.4 AÇÃO ANTIOXIDANTE DOS CAROTENÓIDES

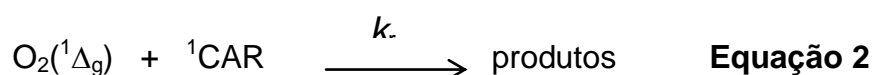
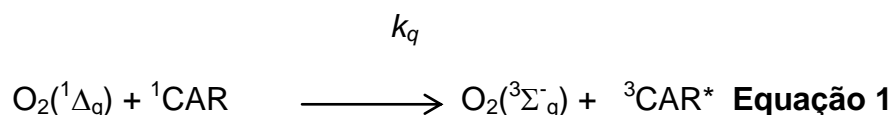
Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações, quando comparada a um substrato oxidável, atrasa ou inibe o processo de oxidação de maneira eficaz. O sistema antioxidante é formado por compostos enzimáticos e não-enzimáticos, estando presentes no organismo, localizado dentro das células ou na circulação sanguínea, e também nos alimentos (SHAMI; MOREIRA, 2004).

Os carotenóides possuem em sua estrutura química ligações duplas conjugadas, que são responsáveis por sua cor e por algumas de suas funções biológicas. Estudos mostram a relação entre o aumento no consumo de alimentos ricos em carotenóides e a diminuição do risco de varias doenças (RIOS, 2009).

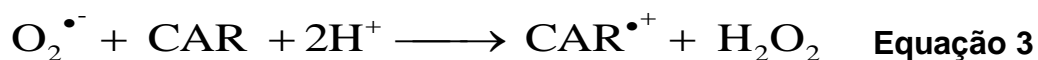
Os carotenóides são conhecidos como excelentes desativadores de espécies reativas de oxigênio e seqüestradores de radicais livres (EDGE; MCGARVEY; TRUSCOTT, 1997). A desativação de oxigênio singlete ocorre através da transferência de energia, podendo tal processo ser físico ou químico (STRATTON; SCHAEFER; LIEBLER, 1993).

A desativação física envolve a transferência de energia de excitação do oxigênio singlete $O_2(1\Delta_g)$ para o carotenóide (1CAR), resultando em formação de oxigênio no seu estado fundamental $O_2(3\Sigma-g)$ e estado triplete excitado do carotenóide (3CAR*). A energia do 3CAR* é dissipada através de interações rotacionais e vibracionais entre o carotenóide e o solvente, para recuperar o estado fundamental do mesmo, sem ocorrer degradação (STAHL; SIES, 1993).

Em contraste com a desativação física (k_q) (Equação 1), o processo químico (k_r) (Equação 2) resulta em destruição do cromóforo e na formação de produtos de oxidação (STRATTON; SCHAEFER; LIEBLER, 1993), com a possibilidade de reações de adição (LIEBLER, 1993; YAMAUCHI; KAWAI; UEDA, 1993).



Radicais de oxigênio, como por exemplo, o ânion superóxido (O_2^-) pode ser reduzido pelo β -caroteno devido à capacidade do carotenóide em doar elétrons para espécies reativas de oxigênio (Equação 3) (CONN; LAMBERT; LAND, 1992).



A presença de grupos substituintes no carotenóide são parâmetros eficientes para avaliar sua capacidade em desativar espécies reativas. Comparação entre a estrutura e a capacidade de desativação entre β -caroteno, licopeno e criptoxantina revelaram que a abertura do anel β -ionona aumenta o potencial seqüestraste, como no caso do licopeno. Substituições por grupos hidroxilas mostraram-se menos efetivos como desativadores. Similarmente, grupos epóxidos e metílicos possuem menor efeito, sugerindo que as propriedades dos carotenóides residem não apenas sobre o comprimento do sistema conjugado de ligações duplas, mas também sobre os grupos funcionais (HIRAYAMA, 1994).

Pesquisas médicas têm mostrado que a grande ingestão de vegetais está associada com a redução dos riscos de doenças degenerativas, como câncer e doenças cardiovasculares. Sendo os vegetais a maior fonte de

carotenóides e devido ao seu potencial antioxidante, os benefícios que estes compostos trazem à dieta alimentar têm sido temas de estudo de muitos pesquisadores (OLIVEIRA, 2005).

Estudos em animais têm mostrado o potencial anticarcinogênico dos carotenóides da dieta, e sua capacidade de seqüestrar os radicais livres, causadores do estresse oxidativo (ANTUNES, 2004).

O urucum é rico em carotenóides sendo o mais abundante encontrado na semente a bixina. Esta tem característica lipossolúvel, e configuração cis, tendo grande aplicabilidade na indústria alimentícia para dar cor aos alimentos, como massas, rações animais, laticínios, entre outros. Com isso o uso da bixina vem crescendo, podendo ser uma alternativa de substituição dos corantes sintéticos (BAUTISTA et al, 2004; RIOS, et al, 2009).

A bixina, um carotenóide usado como corante para alimentos extraído do urucum (*Bixa orellana*) foi avaliada em um modelo de nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos, testada em duas doses diferentes (2,5 ou 5,0mg/kg p.c.). Como resultado, os autores encontraram uma inibição da peroxidação lipídica e a depleção de glutathiona renal. Mostrando que este carotenóide, presente na semente de urucum, pode ser um utilizado como alternativa nos danos nefrotóxicos causados pela cisplatina (SILVA; ANTUNES; BIANCHI, 2001).

2.5 URUCUM

Quando os conquistadores espanhóis chegaram ao Novo Mundo conheceram muitas plantas cujos extratos eram empregados pelos Maias e Astecas. Uma destas plantas, o urucum, existente ao longo da América tropical era usado pelos Índios sulamericanos na coloração de seus corpos, artesanatos, instrumentos de caça e pesca e como repelente de insetos. O nome científico do urucum, *Bixa orellana*, foi dado por Francisco Orellana, após uma expedição na região da Amazônia Setentrional (GIULIANO, ROSATI, BRAMLEY, 2003).

O urucum é uma das maiores fontes naturais de corantes vermelhos. Entre os corantes naturais, o urucum se destaca como o segundo em importância econômica depois do caramelo (MERCADANTE, STECK, PFANDER, 1999).

O urucuzeiro é um arbusto que pode alcançar 2 a 9 m de altura, podendo ser uma planta ornamental (Figura 3) pela beleza de suas flores e frutos (BARBOSA FILHO, 1998). Os frutos possuem formato tipo cápsula ou cachopa, na qual se encontram entre 10 e 50 sementes.



Figura 3: Frutos e Sementes no interior das cachopas (PlantaMed).
Fonte: Barbosa Filho (1998).

Tradicionalmente, o urucum é utilizado pelos índios brasileiros e peruanos como fonte de matéria prima para tinturas vermelhas, usadas para os mais diversos fins, entre eles, protetor da pele contra o sol e contra picadas de insetos. Há também o simbolismo de agradecimento aos deuses pelas colheitas, pesca ou saúde do povo. No Brasil, a tintura de urucum em pó (Figura 4 e 5) é conhecida como colorau, sendo usada na culinária para realçar a cor dos alimentos. Esta espécie vegetal é ainda cultivada por suas flores e frutos atrativos (QUEIROZ, 2006).



Figura 4: Semente de urucum
Fonte: Globo Rural (2006)



Figura 5: Colorau.
Fonte: Globo Rural (2006)

Encontram-se na literatura informações relacionadas ao emprego do extrato do urucum na medicina, como composto adstringente, bactericida, como poderoso agente antioxidante, eficaz no combate aos radicais livres, ou ainda para controle de taxas de colesterol e redução dos níveis de triglicérides no sangue (LIMA et al., 2003).

Estudos homeopáticos indicam seu uso para o tratamento de cardiopatias e endocardite. Outras qualidades medicinais atribuídas referem-se ao emprego no tratamento de hemorragias, dispepsias e queimaduras da pele (NEWMAN; FAIRCHILD, 2002).

A coloração vermelha da semente está diretamente relacionada ao percentual de bixina. Quanto maior a concentração de norbixina, maior a tendência para o amarelo. Tanto as sementes, quanto os extratos processados são comercializados com base no teor de bixina ou norbixina (OLIVEIRA, 2005).

A dose recomendada varia de acordo com cada carotenóide, segundo Joint FOA/WHO e Expert Committee on Food Additives (JECFA) em 2007, a ingestão diária aceitável (IDA) para extrato de urucum é de 250mg/kg de peso corporal e para o carotenóide bixina a IDA é de 0 - 0,065mg/kg de peso corporal, sendo esta a dose utilizada no presente experimento.

Haila, Lievonen e Heinonen (1996) mostraram que o extrato da semente de urucum, contendo bixina como o componente corante preveniu a auto oxidação dos triacilgliceróis *in vitro*. Este resultado indicou que tal efeito

antioxidante pode ser alcançado pela adição deste extrato aos alimentos. Por outro lado, os autores verificaram que o extrato contém vários produtos fluorescentes, não identificados, que co-eluem na análise dos tocoferóis, sugerindo que a bixina poderia não ser o único componente responsável pelo efeito antioxidante do extrato.

2.6 BIXINA

A bixina (metil hidrogênio 9'-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato, C₂₅H₃₀O₄; Figura 6) é o principal pigmento encontrado nas sementes de urucum (*Bixa Orellana* L.) Tal composto é um dos poucos carotenóides que ocorrem naturalmente na configuração cis (PRESTON e RICKARD, 1980; MERCADANTE e PFANDER, 1998; RIOS, 2005).

Pequenas quantidades de norbixina (9-cis-6,6' diapocaroteno- ácido 6,6'-dioico, C₂₄H₂₈O₄) (Figura 6) também são encontradas nas sementes de urucum, tornando carotenóide do urucum solúvel em extratos aquosos (BOUVIER, DOGBO, CAMARA 2003).

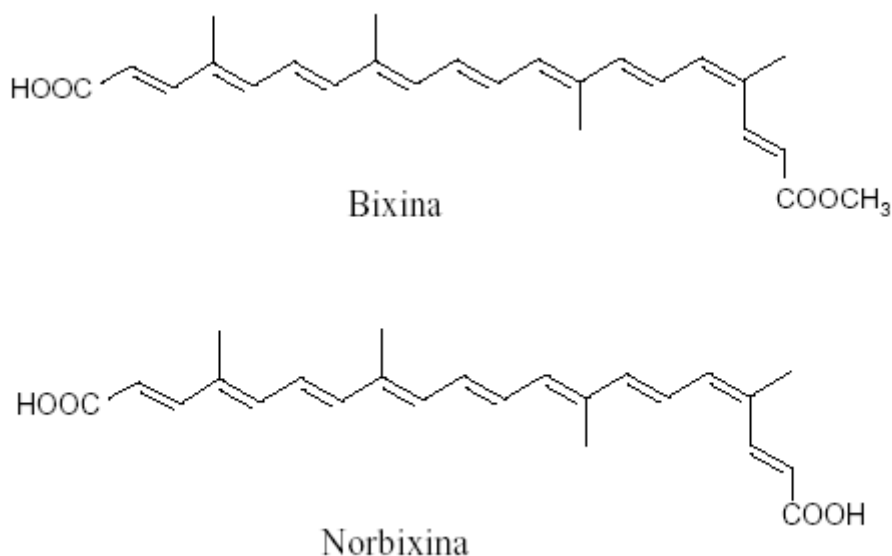


Figura 6: Estrutura da bixina e da norbixina.
Fonte: Rios (2009).

A bixina foi citada pela primeira vez em 1825 por Boussingault e sua cristalização foi obtida com sucesso em 1878 por Etti. A análise elementar e determinação de sua fórmula empírica foram realizadas em 1917 por Heiduschka, Panzer, sendo que em 1928–1933 Kuhn et al. propuseram sua fórmula estrutural, a qual foi confirmada em 1950 por Karrer et al. através da síntese total da per-hidronorbixina (BENHLING, 2004).

Entre os carotenóides naturais, bixina se destaca por ser capaz de interceptar e desativar moléculas reativas de oxigênio singleto, atuando na defesa antioxidante (DI MASCIO; KAISER; SIES, 1989) e protegendo contra efeitos mutagênicos e genotóxicos induzidos (THERESIAMMA e GEORGE, 1998; SILVA; ANTUNES; BIANCHI, 2001).

Segundo Lima et al. (2003) a ação antioxidante da bixina e norbixina, tem importância na prevenção de aterosclerose. Uma vez que as lesões ateroscleróticas iniciam-se após algum tipo de lesão no endotélio, cujo dano é causado principalmente pela lipoproteína LDL oxidada, a inibição da oxidação, resulta na proteção do endotélio.

Lima et al. (2001) induziram hiperlipidemia em coelhos, com uma dieta contendo colesterol. Acrescida a esta ração, foram testados os carotenóides bixina, norbixina e o flavonóide quercetina, sendo a bixina o carotenóide que apresentou a maior redução de colesterol.

Zhang E Lindupl (1993) estudaram o efeito de inibição da peroxidação, avaliando alguns carotenóides, incluindo bixina, constatando sua eficácia na inibição dos consequentes efeitos de transformações neoplásicas induzidas

Speranza et al. (1990) estudaram a interação entre o oxigênio singleto e apocarotenóides, entre eles a bixina, a norbixina e seus isômeros. Os autores relataram que este estudo foi de fundamental relevância para entender os mecanismos de ação que desempenham tais compostos na fotossíntese, como também no seu efeito fotodinâmico. Este estudo foi realizado pelo monitoramento espectrofotométrico da solução de diferentes apocarotenóides, mantida à temperatura constante de 35° C, na presença do 3,4-(4-metil-1-naftil) ácido propiônico 1,4 endoperóxido, empregado como gerador de oxigênio

singlete, alternativo à ação fotoquímica. Esta escolha foi tomada no sentido de evitar reação fotoquímica paralela, como a *trans*-isomerização.

No entanto, o desempenho destes corantes pode ser reduzido devido instabilidade dos produtos naturais. Isto se deve em parte à função que desempenham no metabolismo do organismo vegetal ou animal. Desta forma, muitos compostos estão em constante transformação, em resposta a fatores externos como luz, calor oxigênio, entre outros (OLIVEIRA,2005).

Conforme Rios (2004), os carotenóides totais do urucum podem ser determinados através de leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda máximo de absorbância em 2826 nm. Porém, como os isômeros apresentam espectros de absorbância próximos aos do carotenóide original, torna-se praticamente impossível verificar a presença de isômeros através da simples leitura do extrato total em espectrofotômetro. Atualmente a técnica que utiliza cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de C18 é a mais indicada para separação desses compostos.

Na avaliação de Bautista *et al.* (2004) sobre efeitos tóxicos do tratamento com bixina em ratos Wistar, machos e fêmeas, em regime subagudo de administração (4 semanas, 20 doses, por 28 dias) sugere que a bixina não é tóxica para os roedores.

Há evidências indicando que bixina, além de não ser tóxica, pode apresentar efeito protetor contra dano cromossomal induzido por irradiação-gama em ratos (THERESIAMMA e GEORGGE, 1998).

Os resultados obtidos por Antunes *et al.* (2004) em uma investigação para avaliar a possibilidade de bixina (1.0; 2.5; 5.0; 10µg/mL) induzir aberrações cromossômicas em linfócitos humanos, *in vitro*, apontaram para um efeito anti-clastogênico e uma ação protetora deste carotenóide.

A associação entre baixa toxicidade, o potencial antioxidante e a pouca literatura de estudos *in vivo* sobre a possível atuação no metabolismo tornam a bixina um alvo atraente de pesquisa.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem por objetivo analisar o efeito dos carotenóides bixina e das sementes de urucum no estresse oxidativo induzido pelo fármaco cisplatina em ratos *Wistar*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a composição centesimal das sementes de urucum;
- Extrair e cristalizar bixina;
- Administrar dietas com duas fontes de carotenóides: bixina e urucum e verificar sua possível ação protetora;
- Verificar a atividade das enzimas transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP) no fígado de ratos submetidos a diferentes tratamentos;
- Verificar as dosagens de uréia e creatinina no plasma;
- Realizar a contagem e diferenciação celular;
- Realizar o ensaio TBARS para identificar a ação fisiológica dos antioxidantes no organismo dos animais;
- Verificar dano renal através da histologia.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

ARTIGO 1 - ANTIOXIDANTES DAS SEMENTES DO URUCUM COMO POSSÍVEL AGENTE INIBIDOR DA HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA PELO ANTITUMORAL CISPLATINA.

ANNATTO SEEDS' ANTIOXIDANTS AS A POSSIBLE INHIBITING AGENT OF HEPATOTOXICITY INDUCED BY CISPLATIN ANTITUMOUR

ARTIGO 2 - EFEITOS DO CAROTENÓIDE BIXINA E DAS SEMENTES DE URUCUM SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE RATOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM CISPLATINA.

BIXIN CAROTENOID AND ANNATTO SEEDS EFFECTS OVER HEMATOLOGIC PARAMETERS OF RATS UNDER CISPLATIN TREATMENT

ARTIGO 3 - AÇÃO INIBIDORA DA NEFROTOXICIDADE INDUZIDA PELO ANTITUMORAL CISPLATINA, UTILIZANDO URUCUM E BIXINA.

INHIBITORY ACTION OF THE NEPHROTOXICITY INDUCED BY CISPLATIN ANTITUMOR APPLICATION THROUGH ANNATTO AND BIXIN UTILIZATION

ARTIGO 1

**ANNATTO SEEDS' ANTIOXIDANTS AS A POSSIBLE INHIBITING AGENT OF
HEPATOTOXICITY INDUCED BY CISPLATIN ANTITUMOUR**

**ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM AS NORMAS DA REVISTA FOOD
AND CHEMICAL TOXICOLOGY**

**ANTIOXIDANTS FROM ANATTO SEEDS AS POSSIBLE INHIBITORY AGENTS
OF THE HEPATOTOXICITY INDUCED BY THE ANTITUMOR AGENT
CISPLATIN**

Lucécia Fátima Souza^a, Niara da Silva Medeiros^b, Paula Cilene Pereira dos Santos^c,
Alessandro de Oliveira Rios^d, Carlos Henrique Pagno^e, Daiane Danelli^f, Lívia de Melo^g,
Cleice Dalla Nora^h, Erna Vogt de Jongⁱ

^a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: luceiasouza@ibest.com.br

^b Centro Universitário Metodista IPA, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: niarasm@yahoo.com.br

^c Centro Universitário Metodista IPA, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: paula.santos@metodistadosul.edu.br

^d Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: alessandro.rios@ufrgs.br

^e Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: cpagno@gmail.com

^f Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: liviamarchi@gmail.com

^g Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: daianedanelli@yahoo.com.br

^h Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: cleicenator@gmail.com

ⁱ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: vogt@ufrgs.br

^{a, d, e, f, g, h, i} Endereço afiliação:

Av. Bento Gonçalves, 9500/ Prédio 43.212

Bairro Agronomia

Caixa Postal 15.090

CEP: 91501-970

Campus do Vale - Porto Alegre – Rio Grande do Sul - Brasil

^{b, c} Endereço afiliação:

Rua Cel. Joaquim Pedro Salgado, 80,

Bairro Rio Branco

CEP: 90420-060

Porto Alegre – Rio Grande do Sul - Brasil

* Autor correspondente: Tel/Fax: 55 (51)3308-1037; Email: luceiasouza@ibest.com.br. Endereço postal: Rua Bento Gonçalves, 9500/ Prédio 43.212. Bairro Agronomia. Caixa Postal 15.090. CEP: 91501-970. Campus do Vale - Porto Alegre – Rio Grande do Sul - Brasil

ABSTRACT

Anatto (*Bixa orellana* L.) is a culture of great commercial interest, the main product being the seed, from which the dyes bixin and norbixin, considered to be of great interest on both the national and international markets, are extracted. Much research has been directed at the carotenoids present in anatto seeds, since they are potent antioxidants on account of their oxygen free radical sequestering properties and their ability to inhibit lipid peroxidation “in vitro”. The clinical use of cisplatin (*cis*-diaminodichloroplatina II), a potent antineoplastic agent especially used in the treatment of solid tumors, is limited on account of its side effects such as kidney damage, intestinal toxicity and bone marrow suppression. The effects of anatto seeds and of bixin on the oxidative damage induced by cisplatin in male *Wistar* rats was evaluated in the present study by way of lipid peroxidation, weight gain, the food efficiency coefficient, fat deposits in the hepatocytes and dosing of the enzymes in this organ. The animals were divided into four groups: control group (CG), cisplatin group (CPG), bixin+cisplatin group (CBG) and anatto+cisplatin group (CUG). Cisplatin (5 mg/kg body weight) was injected intra-peritoneally 48 hours before the end of the experiment. The bixin and anatto were administered daily together with the commercial feed. The pre-treatment with anatto and bixin attenuated the cisplatin-induced liver damage and significantly reduced the enzymes AST and ALT. Anatto was shown to be capable of inhibiting lipid peroxidation as determined by TBARS. These results suggest that anatto seeds and bixin could be important agents in the reduction of cisplatin-induced hepatotoxicity.

Keywords: bixin, anatto, cisplatin, rats, antioxidants.

1. INTRODUCTION

The role of nutrition in human health has changed as a consequence of the various transformations occurring in society, and its scientific basis is expanding in the physical and behavioral foundations. The focus of health promotion places the individual at the center of its aims and objectives.

The population is more and more aware of the close relationship between a balanced diet and disease prevention, resulting in an increasing demand for fresh healthy foods, with quality, good appearance and low caloric value.

In addition to the basic nutritional value, various foods offer a variety of possibilities of protecting the organism against the development of cancer and other chronic diseases. Amongst the chemical constituents that have been considered responsible for such protection, the carotenoids, antioxidant vitamins, phenolic compounds, terpenoids, steroids and fibers can be cited (SHAMI; MOREIRA, 2004).

Substances of a natural origin such as the carotenoids, which include bixin (anatto), alpha-carotene and beta-carotene (carrot), lycopene (tomato) and cryptoxanthin, lutein and

zeaxanthin (broccoli) have been used not only for coloring purposes but also for their action as chemical preventative agents. In addition, these pigments can be important in cell protection, acting as antioxidants against free radicals and sequestering singlet oxygen, due to their long system of conjugated double bonds (GOMES, 2007).

Cisplatin is a platinum complex, effective in chemotherapy (ROSENBERG, VANCAMP, 1970). However its use is limited due to some adverse effects, such as nephrotoxicity, ototoxicity, neurotoxicity, myelosuppression, gastrointestinal effects and mutagenesis (WEIJL et al, 1997).

Research has indicated that nutritional therapy can provide benefit in oncologic treatments by minimizing the adverse effects produced by the antineoplastic treatment, improving the patient's state of health (SENDAO, 2006 ; SANTOS, 2008).

Thus in recent years, considerable attention has been given to experiments associating carotenoids with their biological functions in human beings.

The objective of the present study was to evaluate the possible therapeutic action of anatto seeds and of crystals of the carotenoid bixin in reducing the toxicity of the drug cisplatin with respect to liver disorders in male Wistar rats.

2. MATERIAL

The material used was Anatto, with the botanical classification of *Bixa orellana L.*, obtained from the Eldorado access, ICN (189644) 10.VII.2009, J.M.Wiest, and harvested in the ecological park located in the metropolitan region of the city of Porto Alegre, RS, Brazil, a central depression with the following coordinates: 30° 05' S and 51° 40' W. The material was collected from three locations, obtaining both the vegetative and reproductive parts.

Each material was then herborized with the aid of a press and newspaper, and catalogued according to the methodology applied to vegetable taxonomy. The material was then incorporated into the ICN of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. The study was developed in the Bromatology Laboratory of the Institute of Food Science and Technology (ICTA) at the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. The proximate composition (moisture content, lipids, proteins, fiber and ash) of this access was determined according to AOAC methodology (1995).

2.1 PREPARATION OF ANATTO AND BIXIN

The anatto seeds were acquired on the local market in Porto Alegre (RS-Brazil), ground in a blender to obtain the anatto powder and stored under refrigeration ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) until used.

The bixin crystals were obtained according to the methodology developed by Rios e Mercadante (2004). The anatto seeds were washed with hexane (p.a.) and methanol (p.a.) to remove hydrophilic and hydrophobic impurities, and the carotenoid bixin extracted with ethyl acetate (p.a.). The extract obtained was dried in a rotary evaporator ($T < 30^{\circ}\text{C}$) and re-diluted in dichloromethane (p.a.). To crystallize the bixin, the extract was placed on a heating plate ($T < 50^{\circ}\text{C}$), chilled absolute ethanol (p.a.) added, and the mixture cooled in an ice bath and then stored in a freezer for 24 hours. The bixin crystals formed were filtered, washed with chilled absolute ethanol (p.a.), dried in a vacuum oven for 24 hours and stored at -18°C until used.

2.2 CISPLATIN

Cisplatin (*cis*-diaminedichloroplatinum II, cDDP; CAS N^o. 15663-27-1) was kindly provided by the company Quiral Química do Brasil S.A. in its commercial form (Platinil[®]).

2.3 ANIMALS AND THE EXPERIMENTAL DESIGN

The biological assay was carried out in the Vivarium of the Department of Food Science of the Food Science and Technology Institute (ICTA) of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil, and approved by the ethics commission of the same university under the protocol n^o 17809 in the reunion carried out on 29/04/2010, since it was ethically and methodologically adequate according to Resolution 196/96 and the complements of the National Health Council.

The number of experimental animals necessary for each group was determined according to Berndtson (1991), such that 20% of the difference between a treatment and the standard was found and considered to be significant with 95% of confidence (Equation 1).

$$R \geq 2(t_0 + t_1)^2 s^2/d^2$$

Equation 1

Where:

R = the number of repetitions necessary per group in each treatment;

t_0 = *Student t* value associated with the type I error;

t_1 = *Student t* value associated with the type II error;

s = residual mean square;

d = difference between the treatments which one would like to be able to detect.

Twenty-four male Wistar SPF (Specific Pathogen Free) rats were used, each weighing approximately 200 grams, obtained from the UFRGS vivarium.

The animals were randomly divided into 4 groups of 6 rats each, and placed in individual cages all with free access to water and the respective diet at a temperature of $22\pm 2^\circ\text{C}$ and 12-hour light/dark cycle, with a relative humidity between 70 and 80%.

The groups were constituted according to the treatments presented in Table 1.

-Group 1 (CG): control group fed pelleted commercial feed

-Group 2 (CPG): group fed pelleted commercial feed plus cisplatin

-Group 3 (CBG): group fed pelleted commercial feed plus cisplatin and bixin

-Group 4 (CUG): group fed pelleted commercial feed plus cisplatin and anatto powder

The commercial feed NUVITAL[®] was used in these experiments. The pellets were ground, mixed with the carotenoids and placed in pots at the moment offered to the animals.

The doses of bixin (0.060 mg/ kg body weight) and anatto (0.500 mg/kg body weight) used in this study as pre-treatments, were based on data found in the literature as showing nephro-protective effects (PEREIRA et al, 2000; FAO, 2007; ANTUNES e BIACHI, 2004).

Thus the animals were weighed every other day and the amounts of bixin and of the natural dye recalculated accordingly, with the objective of maintaining a constant ratio between the antioxidants offered and the body weight of the animals.

To establish the concentration of the carotenoid bixin to be offered to the animals, the bixin crystals were quantified in a spectrophotometer, using an absorption coefficient ($A^{1\%}_{1\text{cm}}$) of 2826 for chloroform (p.a.) and the maximum reading at a wavelength of 470 nm (TOCHINI e MERCADANTE, 2001).

A single dose of cisplatin (5 mg/kg) was administered 48 hours before the end of the experiment to induce oxidative stress. Such a dose does not cause death of the animals or toxicity as characterized by ataxia, bradypnea or reduced activity (JONES et al., 1985;

BALDEW et al., 1989). Although this is a dose frequently used in animals, according to various authors (ANTUNES et al., 2000, FRANCESCATO et al., 2007; SILVA et al., 2001), it is approximately four to five times higher than that employed in human beings (GONZALEZ et al., 1977; JACOBS et al., 1980)

3. METHODS

3.1 BODY WEIGHT CONTROL, FEED CONSUMPTION AND THE CALCULATION OF THE FOOD EFFICIENCY COEFFICIENT (FEC)

After a two-day adaptation period, the animals were divided into groups and their feed consumption and body weight determined. The amount of diet ingested was determined from the difference in weight between that offered, that left over and the losses.

The control of the weight of the animals and of the diet consumption allowed for calculation of the Food Efficiency Coefficient (FEC), showing the relationship between weight gain and diet consumption (PELLET e YOUNG, 1980).

All the indices were calculated for each individual animal, allowing one to obtain the mean values and standard deviation.

3.2 LIVER EVALUATION

The method described by Rodrigues et al. (2005) was used to collect the blood, the animals being sedated with benzodiazepine (0.25 mg/100g body weight) and anesthetized with sodium pentobarbital (4.6 mg/100g body weight). An incision was then made along the linea alba for the whole of the ventral part, and the blood collected from the ascending aorta for the biochemical analyses. The liver was removed, weighed and the fat extracted using the Bligh e Dyer method (1959).

3.3 LIPID PEROXIDATION EVALUATION

Lipid peroxidation of the cell membranes of the hepatocytes was determined using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method, which measures the level of malondialdehyde derived from peroxidation, according to the adapted methodology of Ohkawa et al., (1979).

The liver samples were homogenized in 0.01M Tris-HCl buffer pH 7.0 in a proportion

of 1:10 mL and then centrifuged at 1,6g for 10 minutes and the supernatant used to determine the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The reaction products were determined by spectrophotometry Ultraspec 3100 pro a 510 nm.

STATISTICAL ANALYSIS

The data were submitted to an analysis of variance (ANOVA) to detect significant differences between the groups, and the Tukey test applied when there was a difference between the means. The differences were considered statistically significant for a value of $p \leq 0.05$.

4. RESULTS e DISCUSSION

The high moisture content of the anatto seeds is a characteristic of the species and fundamental for their survival. This behavior could be a mechanism of adaptation in the sense of assuring perpetuation of the species, since these seeds show reduced longevity, requiring germination soon after separation from the plant (CASTRO, 2004). Corlett (2004) analyzed the cultivar *Bico de Pato* and found 7% moisture, resulting in shooting in 270 days (Table 1).

INSERT TABLE 1

In feeding, fibers are amongst the main factors preventing chronic diseases, acting in the regulation of the lipemic and glycemic indices (ANGELIS, 2001). The crude fiber content of the Eldorado access was higher than those of the cultivars analyzed by Angelucci (1980) and Souza (2000), suggesting that the anatto seeds could be used as a dietary source of fibers (BRASIL, 1998).

Proteins are essential nutrients and should be ingested in the diet, since they are demanded for protein synthesis and for tissue maintenance and repair (SGARBIERI, 1996). Thus new protein sources have been studied, with essential amino acid compositions more adequate for the growth and maintenance of the human organism. The seeds of all the anatto cultivars presented high protein contents. Wurts e Torreblanca (1983) analyzed the quality of the anatto seed proteins and found the following values for the amino acids: lysine (0.88%), isoleucine (0.49%), methionine (0.19%) and tryptophan (0.10%), justifying their importance as a vegetable protein supplement.

The ether extract found in the Eldorado access was smaller than that of the other cultivars analyzed by Souza (2000). Bixin is one of the liposoluble carotenoids found in the anatto, which stands out due to its capacity to intercept and deactivate reactive singlet oxygen molecules, acting in the antioxidant defense (DI MASCIO, 1990) and protecting against induced mutagenic and genotoxic effects (SILVA, 2001). The low lipid content of the seeds could reduce their nutritional value and antioxidant capacity. The ash value was close to the value found in the literature, but studies analyzing the mineral content of these seeds are rare.

a) Quantification of bixin in the dye powder

The dye powder obtained contained 105.08 $\mu\text{g/g}$ bixin. Of all the anatto seeds produced in Brazil, about 25% are used in the preparation of lipo and hydrosoluble extracts, and the rest in the manufacture of '*colorifico*', totally consumed on the internal market. According to Resolution CNNPA 12/78 of the Brazilian Ministry of Health, '*colorifico*' is defined as a product constituted of a mixture of corn grits and cassava flour plus powdered anatto or the anatto oil extract, with or without the addition of salt and edible oils.

This product, destined almost exclusively for the domestic market, imparts a reddish color to rice, risottos, grilled beef slices, chicken, flour mixtures, sauces and cheeses, and is mainly marketed in the Northeastern region of Brazil. MERCADANTE (2001) recommended establishing the amount of anatto to be added to '*colorifico*', which can be controlled by determining the bixin content, with the objective of making the coloration produced by this type of product uniform. The bixin contents found in the present study were within the limits found in the literature (10 to 140 $\mu\text{g/mL}$).

b) Biological evaluation

Table 2 shows the results obtained for weight gain, food consumption and the food efficiency coefficient. It can be seen that the weight of the animals treated with bixin and anatto, was, on average, 18% lower than that of the animals treated with feed without the addition of carotenoid, although without statistical difference.

This behavior could be explained by the high crude fiber content (16.6%) found in the anatto seeds, which decreases the digestibility and exploitation of the nutrients (SOUZA et al., 2010).

INSERT TABLE 2

Another factor that could be involved in the lower weighted gain is the possible involvement of anatto components in the regulation of glycemia. FERNANDES (2002), using

an anatto extract and norbixin in mice and rats treated with commercial feed, observed that the glucose concentration in the mice was reduced (19.5%) in the group receiving the anatto extract (351 mg/kg), whereas the group receiving 0.8 mg/kg norbixin showed a reduction in glucose of 14.4%, the group receiving 7.6 mg/kg a reduction of 20% and the group receiving 66 mg/kg, 21.5%.

c) Evaluation of the fat and enzymes in the liver

The liver is the most important organ with respect to the maintenance of cholesterol homeostasis, and is also the main location for the metabolism of the anatto pigments (CONKLING, 2000). In the present study, no difference in the weight of the liver was found between the different groups of animals (Table 3). However the amount of fat in the organ was statistically higher in the animals administered only cisplatin as compared to the control group. It can be seen that when cisplatin was administered without the presence of carotenoid, fat synthesis and deposition in the liver increased. The total cholesterol of the liver followed the same pattern, although not statistically significant, and the animals in the cisplatin group showed an increase of 32% as compared to the control group.

INSERT TABLE 3

When these results are analyzed together they indicate an improvement in the lipid profile of the animals treated with bixin and anatto, showing that bixin alone or associated with other compounds present in anatto, can affect the lipid metabolism, corroborating with data found in the literature. Lima et al. (2001) observed that the administration of bixin to rabbits via oral was responsible for a 44.03% reduction in total hepatic cholesterol. This reduction is comparable to the results obtained by administering hypocholesterolemic medication (DE PAULA, 2009).

Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) are intracellular enzymes present in large amounts in the cytoplasm and mitochondria of the hepatocytes. Injury or hepatic cell destruction liberates these enzymes into circulation, and thus an increased amount of these enzymes circulating in the blood stream aids in the diagnosis and prognosis of liver diseases. The predominant form found in the blood serum as a result of slight hepato-cellular damage is cytoplasmatic, whilst serious damage results in liberation of the mitochondrial enzyme, increasing the AST/ALT ratio (MOTTA, 2003).

The animals that received a pre-treatment with bixin and anattom showed a reduction

in the concentration of AST activity, whereas the action of this enzyme increased in the animals that received only cisplatin (Table 4). The normal value for the activity of this enzyme was 139 IU/L and did not differ statistically between the groups CBG and CUG.

INSERT TABLE 4

The enzyme AST catalyzes the reaction between oxaloacetic acid + glutamic acid producing α -ketoglutaric acid + aspartic acid in the liver, and variations in the activity of this enzyme can occur due to infectious hepatitis, chronic liver disease, jaundice and myocardial heart attacks (LIMA et al., 2003). De Paula (2009) analyzed the effect of anatto seeds in reducing serum cholesterol and the redox equilibrium, and showed that the treatment with bixin cake decreased the activity of AST in comparison with the non-treated animals.

Bixin showed the greatest reduction (13.44%) in the concentration of ALT, differing statistically from the cisplatin group as shown in Table 4, showing that it protects the liver tissue even in the presence of aggression by cisplatin.

The protection against liver tissue injury can be explained by the induction of the P450 cytochrome. This system is a collection of isoenzymes that catalyzes different types of oxidation reactions (JEWEL, 1999). In their study with rats on the induction of hepatic mono-oxygenases by anatto and bixin, Oliveira et al. (2003) showed that anatto, when administered via oral, activated the mono-oxygenase system of the P450 cytochrome, thus inhibiting liver damage.

d) Determination of the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the liver

In the present study, the antioxidant effect of anatto and bixin on the oxidative damage induced by cisplatin was investigated in male Wistar rats, 48 hours after administration of the antitumor agent. The lipid peroxidation index was evaluated by measuring the increase in malondialdehyde in the liver by dosing the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using the technique developed by Uchiyama e Mihara (1978).

Figure 1 shows the results for TBARS, revealing that pre-treatment with bixin and anatto prevented the lipid peroxidation induced by cisplatin. The animals in the cisplatin group (CG) showed higher TBARS levels, with statistically significant differences when compared with the group that received anatto. MATSUSHIMA et al. (1998), studying the effects of the free oxygen radicals generated by cisplatin on acute kidney failure in rats, used

the same dose of the antitumor agent used in the present study, and analyzed the results 6 hours after administration of the chemotherapeutic agent. Their results also showed an increase in the values for malondialdehyde.

INSERT FIGURE 1

YAMADA (1995) carried out a study on the mechanisms involved in the kidney damage induced in rats by six different nephrotoxic compounds, including cisplatin. The author suggested that the toxic effects caused by cisplatin could be related to the damage caused by reactive oxygen species. Diets containing antioxidant substances are commonly associated with the drug in order to combat these toxic effects and their intensity (CONKLIN, 2000).

Data found in the literature have demonstrated such protection. Baldew et al. (1989), using the same dose of cisplatin employed in the present study, showed an increase in “in vitro” lipid peroxidation and a reduction in the levels of malondialdehyde following treatment with multiple antioxidants, indicating that a combination of vitamin E, selenium and β -carotene could reduce such damage more effectively than diets containing only one antioxidant.

5. CONCLUSIONS

From the results obtained in the present study, it can be seen that bixin and anatto showed desirable nutritional characteristics, since there was no difference in the weight gain of the animals.

There was an increase in fat deposition in the livers of the animals that received cisplatin, and protection of this organ in the animals pre-treated with bixin and anatto.

Pre-treatment with anatto and bixin attenuated the liver injury produced by cisplatin, significantly reducing the enzymatic alterations represented by the activities of AST and ALT.

The TBARS results showed prevention of the lipid peroxidation induced by cisplatin in the liver tissue, indicating the efficiency of both bixin and anatto, the latter being more efficient.

6. REFERECE

Angelis, R. C. 2001. **Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia**

da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas. São Paulo: Atheneu, 2001. 295 p.

ANGELUCCI, E; ARIMA. H. K; KUMAGAI, E.A. Urucu. I. Dados preliminares sobre composição química. **Instituto de tecnologia de alimentos**, São Paulo v. 11. n. 1. p. 89-96. 1980.

Antunes, M. G, Darin, J. D. C, Bianchi, M. L. P.2000. Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adults rats, a dose dependent study. **Pharmacol Res.** 41, 405-411.

Antunes, M. G. A, Bianchi, M. L. P., 2004. Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina. **Rev Nutr.**17, 89-96.

Association Of Official Analytical Chemists - AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16.ed. AOAC, Washington, DC.

Blingh, E. G.; Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction an purification, **Cadad Jour of Biochemis an Phys.** 37, 911-917.

Baldew,G.S, et al., 1989. Selenium-induced protection against cis-diamminedichloplatinum (II) nephrotoxicity in mice and rats. **Cancer Res.** 49, 3020-3023.

Berndtson, W. E. 1991.A Simple, Rapid and Reliable Method for Selecting or Assessing the Number of Replicates for Animal Experiments. **Jour. of Anim. Scien.** 69, 67-76.

BRASIL. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente à informação nutricional complementar **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: < <http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?>. Acesso em: 28 dez. 2009.

Castro, R.D, Bradford, K.J, Hilhorst, H.W.M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: ARTMED, 2004. p. 51-67.

Corlett, F. M. F, Barros, A.C.A, Villela, F.A. 2004. Qualidade fisiológica de sementes de urucum armazenadas em diferentes ambientes e embalagens. Rev. **Bras de semen.** 29, n.2, p. 148-158. 2004.

Di Mascio, P, Devasagayam, T.P, Sies, H. 1990. Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. **Biochem. Soc. Trans.**18, 1054-1056.

Conklin, K.A. 2000. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. **Nutr. Cancer.** 37, 1-18.

De Paula, H. 2009. **Estudo de propriedades funcionais do extrato de sementes de urucum: alegações de redução serico e melhoramento do balanço redox** . Tese (Doutorado em ciências biológicas) Universidade Federal de Ouro Preto.

Fernandes, A. C. S, Almeida, C.A . 2002. 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. **Jour of Nutr Biochem.**13 , 411-420.

FAO/WHO, JECFA. 2007. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Sixty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO. **Expert Committee on Food Additives – JECFA, Who food additives series.**

Francescato , H. D. C, Costa, R. S, Barbosa, F.J, Coimbra, T. M. 2007. Effect of JNK inhibition on cisplatin-induced renal damage. **Nephrol Dial Trans.** 22, 2138–2148.

Gomes, F. S., 2007. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Rev Nutr.** 20, 537-548.

Gonzalez, V, Hayes, D.M, Cvitkovic, E, Sternberg, S.S. 1977. The renal pathology in clinical trials of cisplatinum (II) diamminedichloride. **Cancer.** 39, 1362.

Jacobs, E , et al. 1980. Product yields for the photofission of ^{235}U with 12-, 15-, 20-, 30-, and 70-MeV bremsstrahlung. **Pys Rev.** 21, 237–245.

Jones, T.W, Chopra. S, Kaufmann. S, Flamenbaum.W, Trump. B, F. 1985. Cis-diamminedichloroplatinum (II)- induced acute renal failure in the rat. Correlation of structural and functional alterations. **Lab. Invest.** 52, 363-374.

Jewell, C, O'brien, N.M. 1999. Effect of dietary supplementation with carotenoids on xenobiotic metabolizing enzymes in the liver, lung, kidney and small intestine of the rat. **Bras. Jour. of Nutr.** 81, 235-242.

Lima, L. R. P., et al. Bixina, norbixina e Quercetina e seus Efeitos no Metabolismo Lípidico de Coelho. **Brazilian journal of veterinary research and animal science**, São Paulo, V.38, n^o 4 196-200, 2001

Lima, L. R. P., et al. 2003. Toxicidade Aguda de Rutina e de *Bixa orellana*., **Acta Farm. Bonaerense.** 22, 21-26.

Matsushima, H, et al. 1998. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. **Jour. Labor. Clinical Medical.** 131, p. 518,

Mercadante, A. Z. 2001. **Composition of Carotenoids from Annatto**. In: "Chemistry and Physiology of Selected Food Colorants". J. M. Ames & T. F. Hofmann (eds.). ACS Symposium Series 775, Washington. p. 92-101.

Motta, V. T. Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações. 4 ed. São Paulo: Robe, 2003. 419 p.

Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.** **95**, 351–358..

De Oliveira, A.C, Silva, I.B. Manhaes, R, Paungrtten, F.F. 2003. Introduction of liver monoxygenases by anatto and bixin in female rats. *Braz. Jour. Méd. Biol. Reas.* 36, 113-118.

Pereira, A.V, Kishibe, R, Arika, J., 2000. Bixina e norbixina como agentes pigmentantes da gema de ovos de poedeiras comerciais. In: Reuniao Anual da sociedade Brasileira de Zootecnia. 259p .

Pellet, P.L, Young, V. R. 1980. **Nutritional evaluation of protein foods**. The United Nations University.

Rodrigues, J. P. F. 1995. **Análise de isoenzimas em progênes de meio-irmão do urucum (Bixa orellana L.)**. Viçosa. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal de Viçosa.

Rios, A. O, [Mercadante, A. Z., 2004](#). Otimização das condições para obtenção de padrão de bixina e das etapas de extração e saponificação para quantificação de bixina em snacks extrusados por CLAE. *Alim Nutr.* 15, 203-213.

Rosenberg, B, Vancamp, L., 1970. The Successful Regression of Large Solid Sarcoma Tumors by Platinum Compounds. *Cancer Res.* 30, 1799-1802.

Santos, G. C. Caracterização do efeito protetor do urucum e da bixina sobre a genotoxicidade induzida pelo antitumoral Cisplatina em células de linhagem PC12. 2008.136f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho Faculdade de ciências farmacêuticas – unesp, Araraquara [2008].

Sendão, M. C. et al. 2006. Comparative effects of acute and subacute lycopene administration on chromosomal aberrations induced by cisplatin in male rats. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1334-1339.

Sgarbieri, V.C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: propriedades-degradações-modificações**. Editora Varela, São Paulo, 1996.517p.

Silva, C.R, Antunes, L. M. G, Bianchi , M. L. P. 2001. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. **Pharmacol Res.** 43, 561-567.

Shami, N. I., Moreira, E. A. M. 2004. Licopeno como agente antioxidante. *Rev Nutr.* 17, 227-236.

Souza, L. F, Klug, T . V, Rios, A.O, Jong E.V. 2010. **Composição Centesimal Do Urucum (Bixa Orellana L.) Produzida em um sitio ecológico da Região Metropolitana de Porto Alegre.** 3º Simpósio de Segurança Alimentar. Anais da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Florianópolis.

Souza, H. C. 2000. **Estudo químico e físico-químico dos pigmentos do urucum (Bixa orellana L.) utilizando metodologia simplificada.** Lavras. 43 p. Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais.

Uchiyama, M, Mihara, M. 1978.Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem.** 86, 271-278.

Tocchini, L, Mercadante, A. Z., 2001. Extração e determinação , por CLAE, de bixina e norbixina em coloríferos. **Cienc Tecnol Aliment.** 21, 310-313.

Weij, N.L, Cleton, F.J, Osanto, S, 1998. Free radicals and antioxidants in chemotherapy induced toxicity. **Cancer Treat Rev.** 23, 209-240.

Yamada, J. 1995.Studies on the machanisms of renal damages induced by nephrotoxic compounds. **Nip. Hoigaku Zas.** 49, 447-457.

Wurts, M.L; Torreblanca, R.A. 1983. Analisis de La Boxa Orellana L. (Anchiote) y del desecho generado en la extraccion de sus pigmentos. *Arch latin de Nutr.* n.3. 320-328.

Figure Captions:

FIGURE 1: Determination of the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the livers of rats treated with cisplatin and their respective groups, in 28 days

Table Captions:

Table 2 shows the results obtained for the Eldorado access and the chemical analysis carried

out by Souza (2000).

Table 3: Means and standard deviations for weight gain (WG), food consumption (FC) and the food efficiency coefficient (FEC) of adult rats during 28 days and their respective treatments

Table 4: Means and standard deviations of the profiles for liver weight and fat content and the total cholesterol content in adult rats during 28 days, and their respective treatments

Table 4: Means and standard deviations for the results of the activity of the hepatic enzymes aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) 48h after administering cisplatin

FIGURE 1:

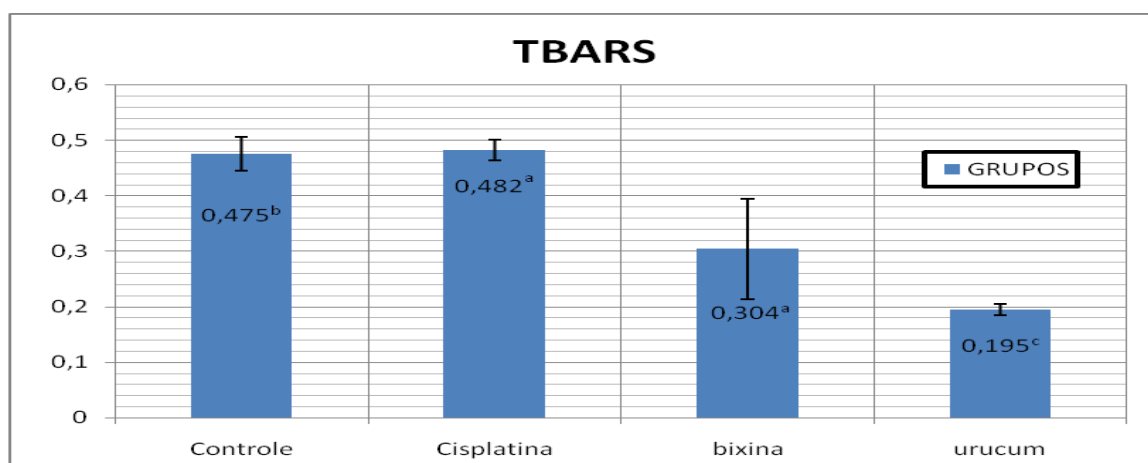


Table 1

Chemical composition (%)					
Cultivars	Moisture	Ether extract	Protein	Fiber	Ash
Eldorado ¹	11.53	3.98	10.01	16.16	3.98
Peruana ²	10.45	8.13	11.46	12.34	4.64
Paulista					
Embrapa 37 ²	11.76	6.38	10.87	10.63	4.82
Caripi ²	10.14	9.20	11.18	12.59	4.11

Source: Analyses carried out in the Bromatology Laboratory of Icta¹. Cultivars analyzed by Souza (2000)²

Table 2:

Treatments	WG (g)	FC (g)	FEC
CG	125.33 ± 20.96 ^a	861.43 ± 36.77 ^a	0.14 ± 0.02 ^a
CPG	124.17 ± 14.40 ^a	888.93 ± 41.43 ^a	0.12 ± 0.04 ^a
CBG	104.66 ± 20.33 ^a	846.13 ± 44.95 ^a	0.11 ± 0.04 ^a
CUG	101.73 ± 21.96 ^a	819.84 ± 44.91 ^a	0.10 ± 0.04 ^a

Treatments presented in Table 1. Values in the same column with different letters indicate statistically significant differences between the means ($p \leq 0.05$).

Table 3:

Treatments	Total cholesterol (mg/dL)	Liver weight (%)	Liver fat content (%)
CG	33.16 ± 10.76 ^a	3.50 ± 0.01 ^a	3.84 ± 0.36 ^a
CPG	44.05 ± 10.11 ^a	3.52 ± 0.01 ^a	5.28 ± 0.42 ^b
CBG	34.58 ± 9.92 ^a	3.47 ± 0.16 ^a	4.42 ± 1.08 ^{ab}
CUG	36.08 ± 5.68 ^a	3.54 ± 0.04 ^a	4.46 ± 0.70 ^{ab}

Treatments presented in Table 1. Values in the same column with different letters indicate statistically significant differences between the means ($p \leq 0.05$).

Table 4:

Treatments	AST (Units/mL)	ALT (Units/mL)
CG	139.25 ± 3.20 ^b	22.31 ± 2.03 ^{ab}
CPG	158.00 ± 4.30 ^a	29.45 ± 5.62 ^a
CBG	136.00 ± 5.20 ^b	19.31 ± 1.51 ^b
CUG	135.50 ± 10.80 ^b	22.00 ± 2.97 ^{ab}

Treatments presented in Table 1. Values in the same column with different letters indicate statistically significant differences between the means ($p \leq 0.05$).

ARTIGO 2

**BIXIN CAROTENOID AND ANNATTO SEEDS EFFECTS OVER HEMATOLOGIC
PARAMETERS OF RATS UNDER CISPLATIN TREATMENT**

**ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM AS NORMAS DA REVISTA REVISTA
BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA**

BIXIN CAROTENOID AND ANNATTO SEEDS EFFECTS OVER HEMATOLOGIC PARAMETERS OF RATS UNDER CISPLATIN TREATMENT

Lucécia Fátima Souza^a, Niara da Silva Medeiros^b, Paula Cilene Pereira dos Santos^c,
Alessandro de Oliveira Rios^d, Carlos Henrique Pagno^e, Daiane Danelli^f, Lívia de Melo^g,
Cleice Dalla Nora^h, Erna Vogt de Jongⁱ

^a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: luceiasouza@ibest.com.br

^b Centro Universitário Metodista IPA, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: niarasm@yahoo.com.br

^c Centro Universitário Metodista IPA, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: paula.santos@metodistasul.edu.br

^d Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: alessandro.rios@ufrgs.br

^e Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email cpagno@gmail.com

^f Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email liviamarchi@gmail.com

^g Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email daianedanelli@yahoo.com.br

^h Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: cleicenator@gmail.com

ⁱ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: vogt@ufrgs.br

^{a, d, e, f, g, h, i} Endereço afiliação:

Av. Bento Gonçalves, 9500/ Prédio 43.212

Bairro Agronomia

Caixa Postal 15.090

CEP: 91501-970

Campus do Vale - Porto Alegre – Rio Grande do Sul - Brasil

^{b, c} Endereço afiliação:

Rua Cel. Joaquim Pedro Salgado, 80,

Bairro Rio Branco

CEP: 90420-060

Porto Alegre – Rio Grande do Sul - Brasil

* Autor correspondente: Tel/Fax: 55 (51)3308-1037; Email: luceiasouza@ibest.com.br. Endereço postal: Rua Bento Gonçalves, 9500/ Prédio 43.212. Bairro Agronomia. Caixa Postal 15.090. CEP: 91501-970. Campus do Vale - Porto Alegre – Rio Grande do Sul - Brasil

RESUMO

A cisplatina (*cis*-diaminodicloroplatina II) é um quimioterápico utilizado isoladamente ou em combinação com outros antineoplásicos no tratamento de câncer de pulmão, cabeça, pescoço, esôfago, estômago, cólon, bexiga, testículos, ovários, útero, entre outros. No entanto seu uso deve ser cauteloso, pois seus efeitos colaterais são graves, podendo causar toxicidade gastrointestinal, neuropatia periférica, mielotoxicidade, astenia, ototoxicidade e toxicidade renal. Estes efeitos adversos têm levado ao desenvolvimento de agentes específicos para amenizar a toxicidade do fármaco. Alguns estudos sugerem que a administração de antioxidantes é capaz de reduzir os danos e proteger os tecidos. Os carotenóides são mais uma opção a ser avaliada, pois são considerados eficazes agentes antioxidantes. O urucum é uma fonte natural de corantes vermelhos e além da bixina (fração lipossolúvel do extrato), estão presentes nas suas sementes, outros carotenóides, como a norbixina, o β -caroteno, a criptoxantina, a luteína e a zeaxantina. Neste estudo, foi avaliado a eficácia do urucum e da bixina na nefrotoxicidade causada pela cisplatina em ratos *wistar*. Pelos resultados, verificou-se que o urucum e a bixina reduziram os níveis de creatinina e uréia. Com relação a hematologia, contagem e diferenciação celular sanguíneo, pode-se observar que houve redução significativa na contagem de neutrófilos do grupo que recebeu a bixina isolada. Com base nos resultados, pode se concluir que o pré-tratamento com bixina e urucum, mostrou-se eficiente na diminuição da injúria renal provocada pela cisplatina.

Palavras-chaves: cisplatina, bixina, urucum, diferenciação celular.

ABSTRACT

The cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum II) is a chemotherapeutic agent used in isolation or in combination with other antineoplastics in treatment of lung, head, neck, esophagus, stomach, colon, urinary bladder, testicles, ovarian and uterus cancers, among others. However, its use must be cautious, because its side effects are serious, possibly causing gastrointestinal toxicity, peripheral neuropathy, myelotoxicity, asthenia, ototoxicity and renal toxicity. These collateral effects have led to the development of specific agents to mitigate the drug toxicity. Some studies suggest that an antioxidant adhibition is able to reduce damages and protect tissues. Thereby, the carotenoids are one more option to be considered, because of its efficiency as antioxidant agents. The annatto is a natural source of red colorants and, besides bixin (extract soluble fraction), there are other carotenoids like norbixin, *b*-carotene, chryptoxanthin, lutein and zeaxanthin. In this study, was evaluated the annatto and bixin efficacy against the nephrotoxicity caused by cisplatin in Wistar rats. According to results, was verified that annatto and bixin decreased creatin and urea tax. Concerning to the hematology, blood cell count and differentiation, can be observed that occurred a significant reduction at neutrophils counting in the group that bixin was given singly. Based on the results, is possible to say that annatto and bixin pretreatment reveals itself as an efficient agent of renal injury decrease caused by cisplatin.

Keywords: Cisplatin. Bixin. Annatto. Cell differentiation.

1 INTRODUÇÃO

A cisplatina (*cis*-diaminodicloroplatina II) é um quimioterápico utilizado isoladamente ou em combinação a outros antineoplásicos no tratamento de câncer de pulmão, cabeça, pescoço, esôfago, estômago, cólon, bexiga, testículos, ovários, útero, entre outros. No entanto seu uso deve ser cauteloso, pois seus efeitos colaterais são graves, podendo causar toxicidade gastrointestinal, neuropatia periférica, mielotoxicidade, astenia, ototoxicidade e toxicidade renal, sendo este último o efeito adverso mais importante ^{1, 2, 3}. Os efeitos antineoplásicos causados pela cisplatina acontecem devido ao seu mecanismo de ação, pois interfere na replicação do DNA através de ligações cruzadas, ativando o gene P53 que induz a célula a entrar em apoptose, reduzindo assim a proliferação celular e crescimento tumoral ². Entretanto, no processo de apoptose há grande formação de espécies reativas, que são moléculas com um ou mais elétrons não pareados, sendo altamente instáveis e com meia-vida curta ⁴. Acredita-se que tais espécies são geradas a partir da mitocôndria e que são a principal causa da nefrotoxicidade gerada pela cisplatina ³.

Uma forma de reduzir a nefrotoxicidade é a adição na dieta de alimentos ricos em componentes antioxidantes, como os carotenóides. Tais compostos possuem duplas ligações conjugadas, reagem com as espécies reativas de oxigênio reduzindo a sua ação deletéria. Estes antioxidantes estão amplamente presentes nos alimentos e também se destacam por suas propriedades coloríferas na indústria de alimentos ^{5, 6, 7, 8}. Entre os corantes naturais mais utilizados destaca-se o urucum, obtido a partir de sementes de *Bixa Orellana L*, uma planta originária da América do Sul, mais especificamente da Região Amazônica (Brasil). Sua coloração pode variar entre o amarelo e o vermelho, sendo a bixina o carotenóide mais abundante, representando cerca de 80% dos pigmentos totais da semente ^{5,9,6}. O urucum apresenta além de ação colorífera, propriedades funcionais que formam a base de diversas funções e ações em organismos vivos devido a presença de compostos antioxidantes ¹⁰. Alguns estudos mostram a ação benéfica do carotenóide bixina, como a capacidade de reduzir o estresse oxidativo, atuando como agente quimiopreventivo, e sua capacidade de reduzir os efeitos de nefrotoxicidade produzido por antitumorais ^{11, 1, 12}.

Visando reduzir os efeitos colaterais causados pela cisplatina, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante do carotenóide bixina e das sementes de urucum, sobre a toxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina em ratos *Wistar* machos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos

O presente estudo foi submetido aos Comitês de Ética em Pesquisa de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e aprovado pela Comissão de ética desta Universidade com o número 17809, na reunião realizada no dia 29/04/2010, por estar adequado, ético e metodologicamente de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde Brasileiro

2.1 Obtenção do urucum e da bixina

As sementes de urucum foram provenientes do comércio local de Porto Alegre (RS-Brasil). Para a obtenção do pó de urucum, as sementes foram trituradas em liquidificador e armazenadas sob refrigeração ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) até o momento do uso.

Os cristais de bixina foram obtidos de acordo com metodologia desenvolvida por Rios e Mercadante (2004). Para tanto, as sementes de urucum foram lavadas com hexano e metanol para retirada de impureza hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo posteriormente realizada a extração do carotenóide bixina com acetato de etila. O extrato obtido foi seco em um evaporador rotatório ($T < 30^{\circ}\text{C}$) e rediluído em diclorometano. Para o processo de cristalização tal extrato foi colocado em placa de aquecimento ($T < 50^{\circ}\text{C}$), adicionado etanol absoluto gelado, resfriado em banho de gelo e colocado em um *freezer* por 24 horas. Os cristais de bixina formados foram filtrados e lavados com etanol absoluto gelado, secos em estufa a vácuo por 24 horas e armazenados a -18°C até o momento de uso.

2.2 Cisplatina

A cisplatina (cis-diamminedichloroplatinum II, cDDP; CAS N^o. 15663-27-1) foi gentilmente cedida, na sua formulação comercial, pela Quiral Química do Brasil S.A. (Platinil[®]).

2.3 Ensaio Biológico

O ensaio biológico foi realizado no Biotério do Departamento de Ciência dos Alimentos, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Foram utilizados 24 ratos *Wistar*, machos, SPF (Livre de Patógenos Específicos), com peso de aproximadamente 200 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo da UFRGS.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 6 ratos cada, colocados em gaiolas individuais, todos com livre acesso a água e à respectiva dieta, em temperatura ambiente de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e controle cíclico de 12 horas luz/escuridão, umidade relativa de 70 a 80 %.

Para o experimento foi utilizado ração comercial NUVITAL[®]. Os *pellets* foram triturados, misturados com os carotenóides e colocados em potes no momento do oferecimento aos animais.

A dose de bixina (0,065 mg/ kg peso corpóreo) e urucum (0,500mg/kg peso corpóreo) usada nesse trabalho como pré-tratamento, foram baseadas em dados da literatura, que mostraram efeito nefroprotetor^{13, 14, 1}.

Para a indução do estresse oxidativo, foi administrado uma única dose de cisplatina (5 mg/kg), 48 horas antes do término do experimento. Esta dosagem não provoca a morte dos animais e nem toxicidade caracterizada por ataxia, bradipneia, atividade reduzida^{15, 16}. Apesar de ser uma dose freqüentemente usada em animais,

de acordo com vários outros autores^{17, 18, 19, 20}, ela é aproximadamente quatro a cinco vezes maior do que a empregada em seres humanos^{21,22}.

2.4 Dosagens de uréia e creatinina

Para coleta do sangue foi utilizado o método descrito por Rodrigues et al²³ onde os animais foram sedados com benzodiazepina (0,25 mg/100g de peso corporal) e anestesiados com pentobarbital sódico (4,6 mg/100 de peso corporal). Posteriormente foi feita uma incisão na linha Alba, por toda a parte ventral, e o sangue coletado na aorta ascendente para análises bioquímicas. A quantificação foi realizada através de kits comerciais adquiridos da LaborClin (Bioliqid). A dosagem de uréia foi realizada em espectrofotômetro (Micronal-digital modelo B342II) pelo teste cinético UV para a determinação de uréia em fluidos biológicos e a creatinina foi dosada pelo método colorimétrico, cinético para doseamento da creatinina em fluidos biológicos. Os resultados das dosagens de uréia e creatinina foram expressos em mg/dL.

2.5 Contagem do diferencial de células sanguíneas

Foi coletado sangue total com EDTA da aorta logo após o abate dos animais. Posteriormente realizou-se o esfregaço sanguíneo, corou-se com corante rápido para hematologia (Instant Prov - New Prov) e realizado o diferencial sanguíneo em microscópio óptico (40X). A contagem do diferencial de células sanguíneas foram expressas em porcentagem (%).

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) para a detecção de diferença significativa entre os grupos e aplicado o teste de *Tukey*, quando houve

diferença entre as médias. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p < 0,05$).

4 RESULTADOS

Neste estudo observou-se que o pré-tratamento com urucum e bixina foram de $0,50 \pm 0,03$ e $0,52 \pm 0,06$, o que reduziu os níveis de creatinina em 13,0% e 14,7% respectivamente, em relação aos animais que receberam apenas ração comercial e a injeção de cisplatina (Figura 1). No entanto esta redução não foi estatisticamente significativa pelo teste de *Tukey* ($p < 0,05$).

Em relação à dosagem plasmática de uréia, neste estudo não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$), apesar de ter ocorrido elevação nos grupos que receberam a administração de cisplatina (GCP $34,70 \pm 3,79$; GCPB $30,75 \pm 2,15$; GCPU $33,16 \pm 2,2$) como mostra a Figura 2.

No que se refere à hematologia, contagem do diferencial de células sanguíneas pode-se observar que houve redução significativa ($p > 0,05$) na contagem de neutrófilos do grupo que recebeu dieta rica em carotenóide bixina ($13,5 \pm 3,50\%$) comparado ao grupo que recebeu apenas cisplatina ($24,6 \pm 9,23\%$) (Tabela 1). Para as demais células, linfócitos, monócitos, basófilos e eosinófilos, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 3).

Em determinadas situações as células sanguíneas estão alteradas, apresentando neutrófilos elevados no sangue, quando há principalmente inflamação aguda (Tabela 1).

5 DISCUSSÃO

A dosagem de creatinina sérica é a mais indicada para acompanhar a evolução da insuficiência renal, pois é o composto nitrogenado menos variável no sangue ²⁴. Por ser um resíduo da creatina, a creatinina livre não é reutilizada no metabolismo corporal sendo excretada por filtração glomerular ^{24, 25}. Lima, Oliveira e Nagem ²⁵ obtiveram redução de 12% na dosagem de creatinina em ratos com dieta

hiperlipêmicas quando comparada com dieta padrão adicionada de bixina 10 mg/ por kg.

Outro marcador bioquímico utilizado para avaliar função renal é a dosagem de uréia plasmática. A uréia é o resultado do catabolismo dos aminoácidos eliminada do corpo predominantemente pelos rins ²⁶. A síntese de uréia é feita exclusivamente pelas enzimas hepáticas, este marcador é bastante instável, pois sofre influência de dieta rica em proteínas, portanto não é tão específica quanto a creatinina para avaliar função renal, mas ainda serve como complemento do diagnóstico de lesão renal ^{27, 26}.

A alteração destas enzimas pode ter ocorrido provavelmente por uma suposta lesão hepática causada pela cisplatina, visto que a uréia é o principal produto do catabolismo das proteínas, ²⁸ sintetizada exclusivamente no fígado ²⁶ e a sua elevação é classificada como causa pré-renal, geralmente resultante de uma obstrução do trato urinário, devido a diminuição da filtração glomerular ²⁴.

É importante avaliar os níveis plasmáticos de creatinina e uréia juntos, porém nem sempre estes dois parâmetros vão estar em níveis elevados concomitantemente. Em casos de situações pré-renais, como uma dieta rica em proteína, catabolismo protéico elevado, desidratação, a uréia pode se encontrar elevada e a creatinina normal. As duas dosagens vão estar alteradas em situações de acometimentos pós-renais, onde há obstruções renais, malignidade, desordens de excreção renal e diminuição da taxa de filtração glomerular ²⁶.

A resposta imunológica pode ser dividida em adaptativa (imune inata) ou não adaptativa, abrangendo as células com capacidade fagocítica, como monócitos, macrófagos e neutrófilos que atuam na destruição de antígenos, o que constitui a primeira linha de defesa humana ²⁹.

Este fato pode ser comprovado neste trabalho, uma vez que a comparação do grupo que recebeu cisplatina com o grupo que recebeu cisplatina/bixina, a bixina provavelmente minimizou os efeitos inflamatórios causados pela cisplatina, pois reduziu significativamente a quantidade de neutrófilos, indicando a provável redução da inflamação provocada pelo antitumoral.

CONCLUSÃO

Tendo em vista os objetivos propostos, e com base nos resultados deste trabalho pode-se concluir que:

A cisplatina, injetada intraperitonealmente na dose única de 5 mg/kg promoveu aumento da uréia e da creatinina plasmática, portanto pode ser considerada nefrotóxica. Tal nefrotoxicidade pode ser explicada, em parte, pelo aumento das espécies reativas de oxigênio durante o tratamento com este quimioterápico.

O tempo de exposição (48 horas) da cisplatina foi suficiente para demonstrar que o quimioterápico causou alguma lesão aguda no rim e que a bixina provavelmente auxiliou na minimização desta inflamação como mostrado pela não elevação dos neutrófilos.

BIBLIOGRAFIA

- 1-ANTUNES, M. G. A.; BIANCHI, M. L. P. Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina. . Rev Nutr. 2004, v.17, p. 89-96.
- 2- TENI, B. Molecular mechanisms of cisplatin and its liposomally encapsulated form, Lipoplatin. Lipoplatin as a chemotherapy and antiangiogenesis drug. Cancer Therapy, 2007. v.5, p. 351-376.
- 3- TENI, B, et al. ALEXANDROS, P.; EVAGELOS, B.; PETROS, C. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. Cancer Therapy. 2007, v.5, p. 537-583.
- 4- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, M. G. A. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Rev Nutr. 1999, v.12, p. 123-130.
- 5- MERCADANTE, A.Z. Composition of Carotenoids from Annatto. Chem. Phys of Sel Col. 2001, v. 775, p. 92-101.
- 6- BAUTISTA, A. R. P. L, et al. Avaliação da toxicidade oral subcrônica da bixina para ratos. Rev Bras Farm. 2004, v. 40, p. 229 -233.

- 7- SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. Rev Nutr. 2004, v.17 p. 227-236.
- 8- GOMES, FS. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. Rev Nutr. 2007, v. 20, p. 537-548.
- 9- GIULIANO, G.; ROSATI, C.; BRAMLEY, P.M. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. Trend Biot. 2003, v. 21, p. 513-516.
- 10- KRINSKY, NI The biological properties of carotenoids. Pur App Chem. 1994, v. 66, p. 1003-1010.
- 11- BERTRAM, J. S.; BORTKIEWICZ, H . Dietary carotenoids inhibit neoplastic transformation and modulate gene expression in mouse and human cells. Amer jour clin nutr, 1995, v. 62, p. 1327-1336.
- 12- RIOS, A.O. ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI , M. L. P. Proteção de carotenóides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. Rev Nutr. 2009, v.20, n.2. p.343-350,2009
- 13- PEREIRA, A.V.; KISHIBE, R.; ARIKI, J. et al. Bixina e norbixina como agentes pigmentantes da gema de ovos de poedeiras comerciais. In: Reuniao Anual da sociedade Brasileira de Zootecnia. 2000, Viçosa. Anais.Viçosa: UFV/SBZ, 2000. p. 259.
- 14- FAO/WHO, JECFA. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Sixty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives – JECFA, Who food additives series: 58(2007).
- 15- JONES, T.W.; CHOPRA, S.; KAUFMANN, J.S.; FLAMENBAUM, W.; TRUMP, B.F. Cis-diamminedichloroplatinum (II)- induced acute renal failure in the rat. Correlation of structural and functional alterations. Lab. Invest. 1985, v. 52, p. 363-374.
- 16- BALDEW, G.S, et al. Selenium-induced protection against cis-diamminedichloroplatinum (II) nephrotoxicity in mice and rats. Cancer Res. 1989, v. 49, p.3020-3023.
- 17- ANTUNES, L. M. G.; DARIN, J. D. C.; BIANCHI, M. L. P. Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adults rats, a dose dependent study. Pharmacol Res. 2000 , v. 41, n. 4, p. 405-411, 2000
- 18- FRANCESCATO, H.D.C, COSTA, R.S, RODRIGUES, CAMARGO, S.M, ZANETTI M.A, LAVRADOR M.A, BIANCHI, M.L.P. Effect of oral selenium administration on cisplatin--induced nephrotoxicity in rats. Pharmacol Res. 2001, v, 43, p. 77-82.
- 19- SILVA, C.R.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI , M. L. P. Antioxidant action of

bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol Res*, 2001, v. 43, p. 561-567.

20- MORA, L.O, ANTUNES, L.M.G, FRANCESCATO, H.D.C, BIANCHI, M,L,P. The effects of oral glutamine on cisplatin- induced lipid peroxidation and nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res*. 2003, v, 47, p 517-22.

21- GONZALEZ, V.; HAYES, D.M.; CVITKOVIC, E.; STERNBERG, S.S. The renal pathology in clinical trials of cisplatinum (II) diamminedichloride. *Cancer*. 1977, v. 39, p.1362.

22- JACOBS, E et al. Product yields for the photofission of ^{235}U with 12-, 15-, 20-, 30-, and 70-MeV bremsstrahlung. *Pys Rev*. 1980, v. 21, p. 237–245.

23- RODRIGUES, H. G. et al. Nutricional Supplementation with Natural Antioxidants: Effect of Rutin on HDL-cholesterol Concentration. *Braz Nutr*. 2003, vol. 16, n. 3, p. 315 – 320.

24- SILVA, L. S . Avaliação de parâmetros bioquímicos nutricionais e do estresse oxidativo em ratos tratados com extrato oleoso de bixina (P.A. LIPO 8%). 2009. 187 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto. 2009.

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

26- BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. Tietz textbook of clinical chemistry and Molecular diagnostics. 4. ed., st Louis, Missouri: Wlsevier Saunders, 2006.

27- SOUZA, E. C. G. Efeito de bixina sobre os parâmetros bioquímicos séricos em ratos. 2001. 129 f. Tese de doutorado (doutorado em ciência dos alimentos). Universidade Federal de Viçosa , Minas Gerais, 2001.

28- BRODY, T. NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY. Academic Press. Londres, 1993. 658p.

29- AGUIAR, S. M. R. Impacto da suplementação alimentar na toxicidade hematológica e na qualidade de vida de mulheres portadoras de câncer de mama sob regime quimioterápico adjuvante. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado),Universidade Católica de Goiás, Goiânia, (2008)

Tabela 1: Média e desvio padrão da contagem do diferencial de células sanguíneas em ratos Wistar submetidos a diferentes tratamento.

	GC (n=6)	GCP (n=6)	GCPB (n=6)	GCPU (n=6)
Neutrófilos (%)	16,5 ± 4,96	24,6 ± 9,23 *	13,5 ± 3,50*	18,33 ±3,72
Linfócitos (%)	73,3 ± 3,88	67,4 ± 9,04	75,5 ± 5,68	72,50 ±3,20
Monócitos (%)	8,0 ± 2,75	7,8 ± 1,92	10 ± 3,57	9,0 ± 4,14
Basófilos (%)	0,2 ± 0,40	0,2 ± 0,44	0,3 ± 0,81	0,16 ± 0,4
Eosinófilos (%)	1,3 ± 1,03	0,4 ± 0,89	0,3 ± 0,81	0,00±0,0

* GCP estatisticamente diferente de GCPB ($p \leq 0.05.$)

GC= Grupo controle; CP= Grupo cisplatina; GCPB= Grupo Cisplatina/bixina.

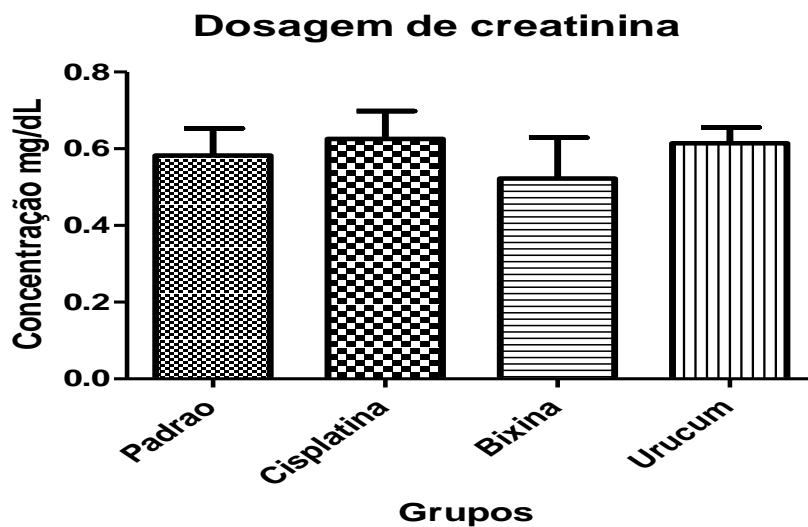


Figura 1: Média e desvio padrão da dosagem de creatinina (mg/dL) no soro de ratos Wistar, 48 horas após a administração da cisplatina.

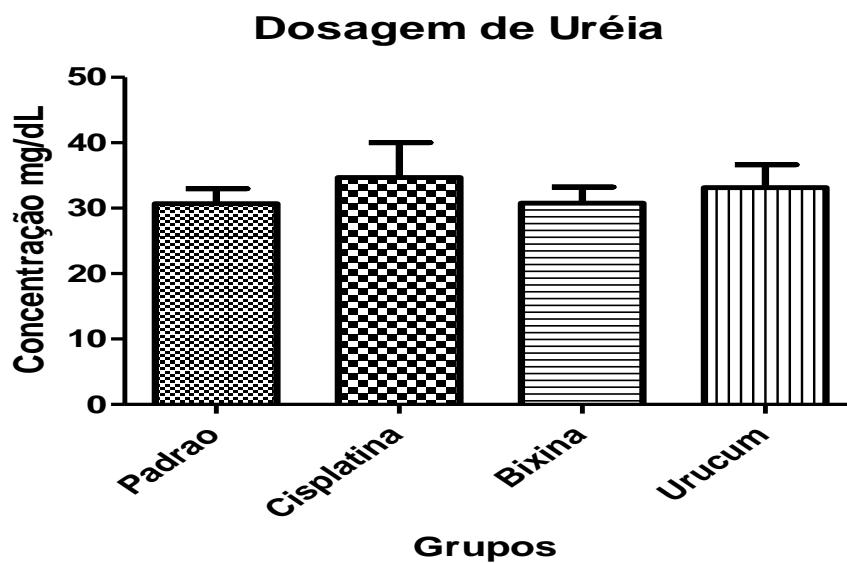


Figura 2: Média e desvio padrão da dosagem de uréia (mg/dL) no soro de ratos Wistar, 48 horas após a administração da cisplatina.

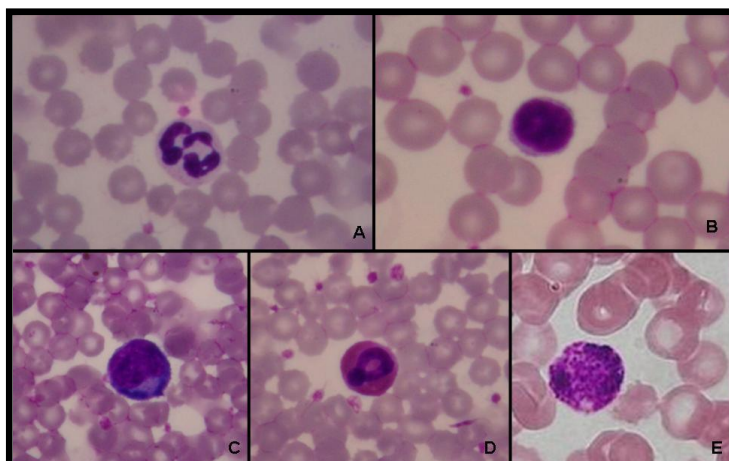


Figura 3: Células sanguíneas. (A) Neutrófilo; (B) Linfócito; (C) Monócito; (D) Eosinófilo e (E) Basófilo, no aumento de 40X.

ARTIGO 3

**INHIBITORY ACTION OF THE NEPHROTOXICITY INDUCED BY CISPLATIN
ANTITUMOR APPLICATION THROUGH ANNATTO AND BIXIN UTILIZATION**

**ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM AS NORMAS DA REVISTA
PHARMACOLOGICAL RESEARCH.**

**INHIBITION OF THE NEPHROTOXICITY INDUCED BY THE ANTITUMOR
AGENT CISPLATIN, USING ANATTO AND BIXIN**

Lucécia Fátima Souza^{*a}, Niara da Silva Medeiros^b, Paula Cilene Pereira dos Santos^c,
Alessandro de Oliveira Rios^d, Erna Vogt de Jong^e

^a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: luceiasouza@ibest.com.br

^b Centro Universitário Metodista IPA, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: niarasm@yahoo.com.br

^c Centro Universitário Metodista IPA, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: paula.santos@metodistasul.edu.br

^d Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: alessandro.rios@ufrgs.br

^e Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Email: vogt@ufrgs.br

^{a, d, e} Endereço afiliação:

Av. Bento Gonçalves, 9500/ Prédio 43.212

Bairro Agronomia

Caixa Postal 15.090

CEP: 91501-970

Campus do Vale - Porto Alegre – Rio Grande do Sul - Brasil

^{b, c} Endereço afiliação:

Rua Cel. Joaquim Pedro Salgado, 80,

Bairro Rio Branco

CEP: 90420-060

Porto Alegre – Rio Grande do Sul - Brasil

* Autor correspondente: Tel/Fax: 55 (51)3308-1037; Email: luceiasouza@ibest.com.br. Endereço postal: Rua Bento Gonçalves, 9500/ Prédio 43.212. Bairro Agronomia. Caixa Postal 15.090. CEP: 91501-970. Campus do Vale - Porto Alegre – Rio Grande do Sul - Brasil

ABSTRACT

The principal carotenoid of anatto (*Bixa orellana L.*), a seed presenting anti-inflammatory activity, is bixin, which is considered of use to human health. Cisplatin is one of the most active chemotherapeutic substances, used in the treatment of a wide variety of solid tumors. The objective of the present study was to investigate the effects of anatto and bixin as possible antioxidant potentials in the nephrotoxicity induced by cisplatin. Both anatto and bixin were administered during 28 days of treatment. The cisplatin was injected intra-peritoneally 48 hours before starting the experiment (5mg/ kg). The rats were sacrificed and the kidneys removed and weighed and soon after fixed in Bouin for a subsequent histological cut. The slices were cut and dyed using the eosin and hematoxylin technique. The use of cisplatin increased the weight of the kidneys of the animals not pre-treated with the carotenoids. Bixin attenuated the renal lesions characterized by the increasing number of morphonuclear infiltrates present in the kidneys of the animals that received only cisplatin. Urucu did not alter the capsular space but did not decrease the number of infiltrates. These results demonstrate the toxic role of cisplatin and suggest a protective effect of bixin with respect to the nephrotoxicity induced by cisplatin in adult Wistar rats.

Keywords: Bixin. Annatto. Kidney. Polymorphonuclears.

1. INTRODUCTION

The carotenoids are a class of pigments widely distributed in nature, found mainly in fruits and vegetables, and are thus present daily in the human diet [1]. In addition to their coloring power, these compounds present functional properties that form the basis of various functions and actions in live organisms. They also take part in the strengthening of the immune system as well as other beneficial actions such as protection against certain types of cancer, heart diseases, cataract and macular degeneration [2].

According to Antunes [3,4], investigations have been directed to identifying the possible protective effect of the antioxidants present in the diet on the nephrotoxicity caused by cisplatin. Such compounds, used during the treatments of cancers in laboratory animals, demonstrate the benefic effects resulting from their capacity to inhibit lipid peroxidation and avoid damage to the DNA. Bixin, a carotenoid extracted from the urucu seed (*Bixa orellana L.*), is widely used as a food dye and also for its capacity to sequester free radicals, causers of oxidative stress.

The presence of compounds such as carotenoids in the diet can contribute to minimizing the effects provoked by free radicals, improve the immune response and provide improved quality of life. Thus an investigation of the benefic effects of these pigments has become highly important.

The objectives of this study were to verify the protective effect of the anatto seeds and of the carotenoid bixin in the possible renal damage caused in Wistar rats by the use of the antitumor agent cisplatin.

2. MATERIAL AND METHODS

The anatto seeds came from the local commerce in the city of Porto Alegre, Brazil. The seeds were ground in a blender to obtain urucu powder and stored under refrigeration. The methodology of Rios and Mercadante [6] was used to obtain the bixin crystals. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II, cDDP; CAS No. 15663- 27-1) was kindly donated in its commercial form by Quiral Química do Brasil S.A. (Platinil[®]).

2.1 Animals and the experimental protocol

Twenty-four adult male Wistar rats, weighing approximately 200g each were used in this study, divided into 4 groups, CG (control group), CPG (cisplatin group), CPBG (cisplatin/bixin group) and CPAG (cisplatin/anatto group). The biological trial lasted 28 days, the CG receiving commercial rodent feed, the CPG receiving commercial feed plus cisplatin (5mg/kg body weight), the CPBG receiving commercial feed, bixin (0.065mg/kg body weight) and cisplatin (5mg/kg body weight) and the CPUG receiving the commercial diet, cisplatin (5mg/kg body weight), and anatto (0.500mg/kg body weight).

The cisplatin was administered in a single dose intraperitoneally 48 hours before sacrificing the animal [7] and CPBG and CPAG received the carotenoid bixin and urucu as from the first day together with the commercial feed. The animals were placed in individual cages, with *ad libitum* access to water and feed, at an environmental temperature of 22±2°C and a 12 hours light/dark control cycle with a relative humidity of 60±70%.

The animals were weighed every other day and the amounts of carotenoids recalculated, with the objective of maintaining the ratio constant between the antioxidants offered and the animal's body weight. The study was approved by the Ethics Committee of the Rio Grande do Sul Federal University in Porto Alegre – RS, Brazil, in their meeting on 29/04/2010 with a protocol nº of 17809.

2.2 Statistical analysis

The data were submitted to an analysis of variance (ANOVA) to detect significant

difference between the groups, and Tukey's test applied when there was a difference between the means. The differences were considered statistically significant when the value for $p \leq 0.05$.

2.3 Determination of the weight and preparation of the kidneys for histology

The animals were sedated with Benzodiazepine (0.25mg/100g body weight) and anaesthetized with sodium pentobarbital (4.6mg/100g body weight), 48 hours after receiving the intraperitoneal injection of cisplatin, and sacrificed by breakage of the diaphragm in order to remove the kidneys.

The kidneys injected with saline solution until complete removal of the blood and then weighed on a Micronal B 600 balance and fixed in Bouin.

The material was prepared for histology using the habitual techniques [8]. After fixing for 24 hours, the sample tissues were cryoprotected with sucrose solutions at increasing concentrations from 70 to 100% and frozen in nitrogen [9]. In sequence each piece was cut at intervals with a thickness of 15 μm , and the product placed on glass slides and dyed with hematoxicilin-eosin (H&E).

The histological and morphometric parameters were obtained using an Olympus® Bx50 optical microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

3. RESULTS AND DISCUSSION

In the macroscopic examination, the kidneys of all the rats used in this experiment showed a normal appearance, with a pink-red color and firm consistency.

On evaluating the weight of the kidneys in relation to the body weight, a possible edema of this organ was searched for, which could be related to a local inflammatory process. In rats treated with cisplatin an increase in the ratio of the weight of the kidneys has been observed [10], and the results presented in this study confirmed this finding. Amaral [11], studying the effect of resveratrol in the inhibition of nephrotoxicity in rats, verified the protective effect of this agent with respect to the deleterious effects on the kidneys of animals treated with cisplatin.

Pre-treatment with urucu before administering the cisplatin effectively inhibited the increase in weight of the kidneys, following the same body weight standard, which was statistically smaller in the animals of this group. The bixin group did not differ statistically from the cisplatin group, although the weight of the renal tissue of this group was not as high as that of the cisplatin group (Table 1).

INSERT TABLE 1

In rats an increase in kidney weight is described as reflecting the nephrotoxicity related to necrosis of the tubular epithelium caused by cisplatin [12]. In the present study a similar association was observed in the animals that received only cisplatin, since the animals in this group presented a relative increase in the weight of the kidneys and histological alterations, in addition to an increase in inflamed cells.

According to Bonventre [13], there are various mechanisms by which a kidney lesion can be potentialized by the neutrophils. These are activated by inflammatory mediators including cytokins, reactive oxygen species and eicosanoids, which increase the adhesion molecules in the endothelium. The polymorphonuclears (PMN) attracted during the process of reperfusion, are considered important mediators at the start of a parenchymal lesion in acute ischemic renal failure. On the other hand, the infiltration velocity of mononuclear leucocytes can vary depending on the kidney damage [14].

From the histology of the kidneys, the characteristic structures forming this organ can be seen. The presence of glomerules can be seen in the cortical region, surrounded by twisted proximal and distal tubules (Figure 1).

The renal tissue of the animals that received cisplatin showed polymorphonuclear (PMN) infiltrates in the glomerular region, characteristic of inflammatory alterations. According to Faraco [15], the number of PMN on the inside of the glomerular capillaries can be used as an index of the inflammatory activity in the glomerulopathys, including acute glomerulonephritis [16].

INSERT FIGURE 1

Acute glomerulonephritis, in addition to the presence of macrophages and PMN, is characterized by an increase in volume of the glomerules, with proliferation of the mesangial cells [15, 16]. In the present study, the kidneys of the cisplatin group presented glomerular alterations characterized by PMN infiltrates, which could indicate a possible acute glomerulonephritis. However the kidneys of the animals who received a pre-treatment with bixin did not present PMN infiltrates, which could be an indication of the protection of this organ with respect to the inflammation caused by the antitumor agent used.

The data obtained in the present study corroborate data found in the literature concerning the damage caused by cisplatin. Behling et al. [17], studying the effect of multiple doses of quercetin in inhibiting the renal damage caused by cisplatin, showed that the administration of this flavonoid prevented and significantly reduced renal damage, and that treatment with cisplatin without quercetin increased the levels of plasmatic creatine, lipid peroxidation and renal damage as visualized in the histology of this organ.

The renal histology of the group that received cisplatin/anatto did not present the same protection as the bixin group. This difference could be explained by the dose used in the present study, which could have been excessive. Santos [18] studying the protective effect of anatto and of bixin in the genotoxicity of urucu in PC 12 cells, verified that concentrations of 2.0, 3.0 and 4.0 $\mu\text{g/mL}$ of urucu induced genotoxic damage in the PC 12 cells, using the micronucleus test. However when the pre-treatment was applied using urucu concentrations of 0.2, 0.5 and 1.0 mg/mL , it presented protection of between 66.4% and 76.7% for the PC 12 cells against the chromosomic damage induced by cisplatin. Some carotenoids when used in very high doses fail to present the desired effect and can act as pro-oxidants [19].

The pro-oxidant activity of the flavonoids is directly proportional to the total number of hydroxyl groups [20]. In the study of Hanasaki et al. [21] it was shown that a series of mono and dihydroxyflavonoids presented no detectable pro-oxidant activity, whereas multiple hydroxyl groups, especially on the β -ring, significantly increased the production of hydroxyl radicals in the Fenton system. This pro-oxidant effect is responsible for the cytotoxic and pro-apoptotic effects of the flavonoids isolated from various medicinal herbs [22]. Such information suggests that the same structural attribute that improves the antioxidant capacity can provoke oxidative stress and functional and structural damage to the cell molecules.

The balance between antioxidant and pro-oxidant activities is an important consideration when planning clinical interventions, principally if its activity results in potentially deleterious effects, such as the induction of adductors and breaks in the DNA chains [23].

Alves et al. [24] in an *in vivo* study using simultaneous treatment with urucu and the antitumor agent cyclophosphamide, observed that urucu increased the frequency of micronuclei in the bone marrow cells of rats, and did not manage to impede the mutations induced by the antitumor agent.

With respect to the proximal and distal tubules, no differences were observed between the groups, showing that neither cisplatin nor the pre-treatments with bixin and anatto had any

effect on them. This is to the contrary of that found by Beahling et al. [17], who used the same dose of cisplatin as used in the present study (5mg/kg) and found morphological alterations such as necrosis of tumoral-tubular cells. However, since the exposition time to the drug (5 and 20 days) was greater than that applied in the present study (2 days), this could have influenced the findings, since the exposition time can aggravate the damage caused by cisplatin [25].

De Conti et al., [26], who studied patients submitted to cisplatin therapy, observed that the persistence in the renal alterations could be related to the fact that the renal excretion of this drug is extremely slow, thus exposing the tubular epithelium of the kidneys to a prolonged deleterious effect.

4. CONCLUSIONS

In conclusion, it was shown in the present study that under the experimental conditions used, the pre-treatment with anatto was not effective in inhibiting renal inflammation as characterized by the PMNs. However bixin, in the form of a pre-treatment, attenuated the histological renal lesions, preventing an increase in the number of PMN, and showing a possible protection against the acute inflammatory process caused by cisplatin.

The weight of the kidneys of the animals which only received cisplatin was greater than that of the other groups, evidence of a possible inflammatory edema.

Additional studies are required using different concentrations of cisplatin and times, in order to identify the properties of anatto and bixin and clarify, amongst other factors, the possible protective mechanism of these agents.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by CAPES.

REFERENCES

- [1] Antunes LMG, Darin JDC, Bianchi MLP. Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. *Pharm Res* 2001; 43: 145–150.
- [2] Krinsky NI. The biological properties of carotenoids. *Pure Appl Chem* 1994; 66:1003-1010, 1994.

- [3] Antunes LMG, Bianchi MLP. Dietary antioxidants as inhibitors of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Rev Nutr* 2004; 17: 89-96.
- [4] Antunes LMG, Bianchi MLP. Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats, a dose dependent study. *Pharm Res* 2000; 41: 405-411.
- [5] Antunes LMG, Bianchi MLP. Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina. *Rev Nutr* 2004; 17: 89-96.
- [6] Rios AO, Mercadante A Z. Otimização das condições para obtenção de padrão de bixina e das etapas de extração e saponificação para quantificação de bixina em "snacks" extrusados por CLAE. *Alim Nutr* 2004; 15: 203-213.
- [7] Silva CR, Antunes LMG, Bianchi MLP. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromossome aberrations and lipid peroxidation in rats. *Pharm Res* 2001; 43: 561-566.
- [8] Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin, LH. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington DC: American Registry of Pathology, 1994.
- [9] Kierszenbaum, A. L. *Histology and cell biology an introduction to pathology*. Editor Mosby an Elsevier, 616 p; 2007.
- [10] Saad SI, Najjar, TA, Alashari, M. Role of non-selective adenosine receptor blocad and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Phys* 2004; 31: 862-867.
- [11] Amaral CL. Efeito do resveratrol na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos. 2006. 102 f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências farmacêuticas de São Paulo (USP). Ribeirao Preto. 2006.
- [12] Cadernas S, Barja G. Resveratrol, melantonin, vitamin E and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃. *Free Rad Biol Med* 1999; 26: 1531-1537.
- [13] Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 2004; 66: 480-485.
- [14] Ysebaert DK, De Greef K, De Beuf A, Van Rompay AR, Vercauteren S, Persy VP, De Broe MET. Cells as mediators in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 2004; 66: 491-496.
- [15] Faraco P. Método de quantificação de infiltrado neutrofilico em capilares glomerulares. *J Bras Nefrol* 1996; 18: 248-251.
- [16] Oliveira RG, *Blackbook Pediatria*. Editor Blackbook. Belo Horizonte, 2005, 3 ed.

[17] Behling B, Sendao MC, Francescato HDC, Antunes LMG, Costa RS, Bianchi MLP. Comparative study of multiple dosage of quercetin against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rat kidneys. *Pharmacol Reports* 2006; 58: 526-532.

[18] Santos GC. Caracterização do efeito protetor do urucum e da bixina sobre a genotoxicidade induzida pelo antitumoral Cisplatina em células de linhagem PC12. 2008.136 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho Faculdade de ciências farmacêuticas – UNESP, Araraquara, 2008.

[19] Rios A de O, Antunes LMG, Bianchi MLP. Proteção de carotenóides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. *Alim Nutr* 2009; 20: 343-350.

[20] Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 749-760.

[21] Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1994; 1: 845-850.

[22] Ueda S, Nakamura H, Masutani T, Sasada A, Takabayashi Y, Yamaoka J, Yodoi J. Bacalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. *Mol Immunol* 2002; 38: 781-791.

[23] Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1955-1968.

[24] Alves L, Azevedo L, Ribeiro LR, Salvadori MDF. Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. *Food Chem Toxicol* 2003; 41: 189-192.

[25] Gonzales-Vitale JC, Hayes DM, Cvitkovic E, Stenberg SS. The renal pathology in clinical trials of cis-platinum (II) diamminedichloride. *Cancer Chemother Rep* 1977; 39: 1362-137.

[26] De Conti RC, Toftness BR, Langer RC, Creasey WA: Clinical and pharmacological studies with *cis*-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res* 1973; 3: 1310-1315.

Figure Captions:

Figure 1: 1: Control group: A=distal tubule, B=dense macula, C=extraglomerular mesangial cells, D=podocyte, E=glomerulus, F=Bowman capsule, G=capsular space. 2: Cisplatin group: Capsular membrane (asterisk), Polymorphonuclear infiltrate (square), mensangial cell (arrow). 3: Cisplatin+bixin group. 4: Cisplatin+anatto group. Magnification x200.

Table Captions:

Table 1: Mean and standard deviation of the ratio of final body weight to kidney weight in Wistar rats submitted to different treatments.

Figure 1:

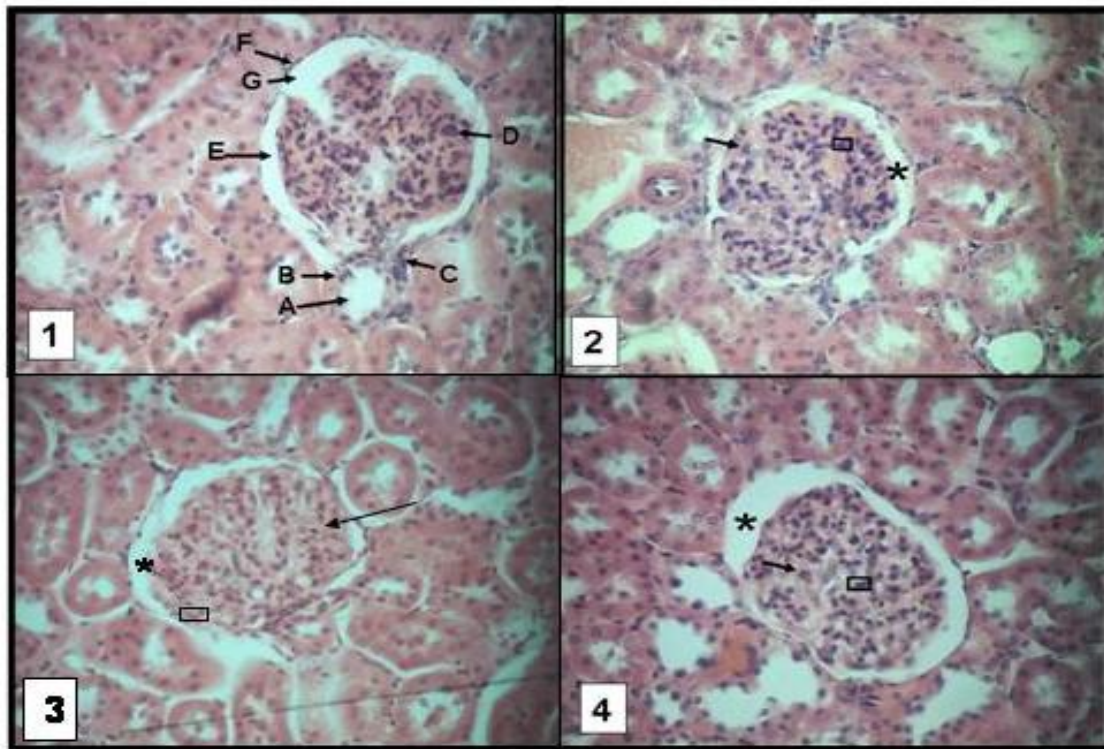


Table 1:

		Initial weight	Final weight	Renal weight
	n	(%)	(%)	(%)
CG	6	250,31 ± 13,8 a	375,71±24,81 a	1,36±0,10a
CPG	6	244,81±16,90 a	369,42±21,48 a	1,41±0,21 a
CPBG	6	249,11 ±16,70 a	353,61±10,30 a	1,38±0,10 a
CPAG	6	253,01 ±28,80 a	347,11±24,89 a	1,23±0,10 b

Values in the same column with different letters show statistically significant differences between the means ($p \leq 0.05$). CG = Control group; CPG = Cisplatin group; CPBG = Cisplatin/bixin group, CPAG = Cisplatin/anatto group.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vários estudos têm sido realizados com a finalidade de entender os efeitos de alguns micronutrientes na modulação dos danos induzidos por quimioterápicos como a cisplatina. Neste trabalho, o objetivo geral foi investigar o efeito das sementes de urucum e do principal carotenóide presente nestas sementes, a bixina, nos efeitos colaterais que a cisplatina apresenta.

A cisplatina acumula-se no fígado, baço e principalmente nos rins, onde concentrações substancialmente altas ultrapassam aquelas encontradas no plasma e em outros órgãos. O acúmulo renal de cisplatina provavelmente envolve a função excretora do rim, pois a maior parte desse fármaco e/ou seus metabólitos são eliminados pela urina.

Manifestações da nefrotoxicidade da cisplatina incluem redução da taxa de filtração glomerular e aparecimento de necroses não específicas nos túbulos proximais e ductos coletores, conforme observado em estudos histopatológicos. Pela composição centesimal e a quantificação do teor de carotenóides totais, pode-se perceber que as sementes de urucum apresentaram valor nutricional desejável, com alto teor de proteína e de fibra bruta. Estas características podem ter influenciado no ganho de peso dos animais do grupo urucum e bixina, que foram menor do que os animais do grupo padrão. O teor de carotenóides destas sementes foram próximas às citadas na literatura.

O pré-tratamento com urucum e bixina atenuou a lesão hepática produzida pela cisplatina, reduzindo significativamente as alterações enzimáticas representadas pela atividade da aspartato amino-transferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

A deposição de gordura no fígado ficou aumentada nos animais que receberam apenas a cisplatina. Esse aumento foi acompanhado por maior peroxidação lipídica e conseqüentemente dano maior neste órgão.

Ao analisar o dano no tecido renal, verificou-se que a cisplatina, injetada intraperitonealmente na dose única de 5 mg/kg promoveu aumento da uréia e da creatinina plasmática, portanto pode ser considerada nefrotóxica. Estas não estavam

aumentadas nos animais com pré-tratamento de bixina ou urucum.

Na análise da quantificação e diferenciação celular, observou-se que tempo de exposição (48 horas) à cisplatina foi suficiente para demonstrar que o quimioterápico causou alguma lesão aguda nos rins e que a bixina, provavelmente, auxiliou na minimização desta inflamação como pode ser visto pela não elevação dos neutrófilos.

Pela análise histológica dos rins dos animais verificou-se infiltração glomerular e possível glomerulonefrite aguda nos animais que receberam o antitumoral cisplatina. O pré-tratamento com a bixina atenuou as lesões histológicas renais, preveniu a elevação do número de células inflamatórias mononucleares e o aumento do espaço glomerular caracterizado pelo aumento da proliferação celular. O pré-tratamento com urucum não foi efetivo na inibição da inflamação renal, caracterizada pelos PMNs, o que pode ser explicado pela dose utilizada e este carotenóide.

Serão necessários estudos adicionais para identificar as propriedades do urucum e da bixina para esclarecer o possível mecanismo protetor destes agentes antes de utilizá-lo como agente protetor renal e hepático em humanos.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Dietary antioxidants as inhibitors of cisplatin-induced nephrotoxicity. **Revista de Nutrição**, Campinas, SP, v.17, n.1, p.89-96, 2004.
- APPENROTH, D. et al. Age dependent differences in the functional and morphological impairment of kidney following cisplatin administration. **Exp. Pathol.**, v. 38, p. 231-239, 1990.
- BALIGA, R. et al. *In vitro* and *in vivo* evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Kidney Int.**, v. 53, p. 394-401, 1998.
- BAUTISTA, A. R. P. L, et al. Avaliação da toxicidade oral subcrônica da bixina para ratos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**, v. 40, p. 229 -233, 2004
- BARROS, E.J.G.; BOIM, M.A.; SANTOS, O.F.P.; SCHOR, N. Effect of cisplatin on glomerular hemodynamics. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, v. 22, p. 1295-1301, 1989.
- BARBOSA, F. J .M.; SILVA, F, R. N.; LIRA, B. F. et. al. Teor de bixina em quatro variedades de *Bixa orellana* L. cultivadas na Paraíba. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 7, p. 41-47, 1998.
- BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CAMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science*, v. 27, p. 2089-2081, 2003
- BEHLING, B. **Efeito de doses múltiplas de quercetina na redução da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos**. Dissertação (dissertação de mestrado), 2004. 139 f Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara. 2004.
- BIANCHI, Maria de Lourdes Pires ANTUNES, Lusânia Maria Gregg. Free radicals and the main dietary antioxidants, **Revista de Nutrição**, Campinas.v.12, n. 2, p.123-130, 1999.
- BRASIL. **Ministério da Saúde**. ANVISA. Resolução 385, de 5 agosto 1999. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 25 abr. 2010.
- CHO, J.-M.; MANANDHAR, S.; LEE, H.-R et. al. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: implication to cancer cell resistance. **Cancer Lett.**, v.260, n.1-2, p.96-108, 2008.

CONN, P. F.; LAMBERT, C. R.; LAND, E. J. et. al. Carotene-oxygen radical interactions. **Free Rad. Res. Commun.**, 16: 401-408, 1992.

CORDER, R.; et al. n-1 Syntesis Reduced by Red Wine. **Nature**, v. 414, p. 863, 2001.

CHAUDHRY, Y. Carotenoids- Natural Food Colors and Health Benefits- Symposium 12- **Interaction of Natural Colors with Other Ingredients**, 2003.

DA LUZ, P. L.; COIMBRA, S. R. Wine, Alcohol and Atherosclerosis: Clinical Evidences and Mechanisms. Brazilian **Journal of Medical and Biological Research**. Vol. 37, n. 9, p. 1275-1295, 2004

DiMASCIO, P. D.; KAISER, S. SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 274, p. 532-538, 1989.

DE CONTI, R.C.; TOFTNESS, B.R.; LANGER, R.C.; CREASEY, W.A. Clinical and pharmacological studies with *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Cancer Res.**, v.33, p. 1310-1315, 1973.

EDGE, R.; MCGARVEY, D. J.; TRUSCOTT, T. G. The carotenoids as anti-oxidants – a review. **J. Photochem. Photobio. Biol. B**, 41: 189-200, 1997.

ENGLER, M.B.; ENGLER, M.M. The vasculoprotective effects of flavonoid-rich cocoa and chocolate. **Nutrition Research**. Vol. 24, p. 695-706, 2004.

FAO/WHO, JECFA. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Sixty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives – JECFA, Who food additives series: 58(2007)

FONTANA, J.D. **Carotenóides: cores atraentes e ação biológica**. Disponível em: <http://www.herbario.com.br/dataher06/1112carotenoid.htm>. Acesso em: 23 março 2010.

GELETTI, Y. V. et al. The Determination of Total Concentration and Activity of Antioxidants in Foodstuffs. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 501-514, 2002.

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

GOMES, Fabio da Silva. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 5, p. 537-548, set./out. 2007.

GORDON, J.A.; GATTONE, V.H. Mitochondrial alterations in cisplatin-induced acute renal failure. **Am. J. Physiol.**, v. 250, p. 991-998, 1986.

HAILA, K. M., LIEVONEN, S. M., e HEINONEN, M. I. Effect of Lutein, Licopeno, Annatto, And α -Tocopherol on Autoxidation of Triglycerides. **Journal Of Agricultural e Food Chemistry**, 44, 2096-2100, 1996.

HARTMANN, J.T.; LIPP, H.P. Toxicity of platinum compounds. **Expert Opin. Pharmacother.**, v.4, n.6, p.889-901, 2003.

HIRAYAMA, O. et al. Singlet oxygen quenching ability of natural occurring carotenoids. **Lipids**, v. 29, p. 149-150, 1994.

KARRER, P e JUCKER, E. Carotenoids. **Elsevier Publishing Company Inc.**, 384 p., 1950.

JAMIESON, E.R.; LIPPARD, S.J. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. **Chem. Rev.**, v.99, n.9, p.2467-2498, 1999.

JONES, T.W.; CHOPRA, S.; KAUFMANN, J.S.; FLAMENBAUM, W.; TRUMP, B.F. Cis-diamminedichloroplatinum (II)- induced acute renal failure in the rat. Correlation of structural and functional alterations. **Lab. Invest.**, v. 52, p. 363-374, 1985.

LIMA, L. R. P., OLIVEIRA, T. T., NAGEN, T. J., PINTO, STRIGUETA, P. C. TINOCO, A. L. A. S., e SILVA, J. F. Bixina, norbixina e Quercetina e seus Efeitos no Metabolismo Lípidico de Coelhos. Brás. **J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, V.38, n^o 4 196-200, 2001

LIMA, L. R. P., OLIVEIRA, T. T., NAGEN, T. J., PINTO, A S., LIMA, E. Q. e SILVA, J. F. Toxicidade Aguda de Rutina e de *Bixa orellana*., **Acta Farm. Bonaerense**, 22 (1), 21-26, 2003.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure Appl. Chem.**66:1003-1010, 1994.

MARKMAN, M. Toxicities of the platinum antineoplastic agents. **Expert Opin. Drug Saf.**, v.2, n.6, p.597-607, 2003

McCLAY, E.F.; HOWELL, S.B. Review: intraperitoneal cisplatin in the management of patients with ovarian cancer. **Gynecology Oncology**, v. 36, p. 1-6, 1990.

NEWMAN, H. FAIRCHILD TROPICAL GARDEN-**Botanical Resource Center**. Disponível em <<http://www.virtualherbarium.org>>. Consultado em 23/11/2002.

MERCADANTE, A. Z.; PFANDER, H. Carotenoids from annatto: A review. Recent. **Food Chemistry**, v. 2, p. 79-91, 1998.

MERCADANTE, A. Z. **Composition of Carotenoids from Annatto**. In: "Chemistry and Physiology of Selected Food Colorants". J. M. Ames e T. F. Hofmann (eds.). ACS Symposium Series 775, Washington. 2001. p. 92-101.

MERCADANTE A. Z., STECK A. e PFANDER H. Three Minor Carotenoids from Annatto (*Bixa orellana*) Seeds. **Phytochemistry**. 52, (1) 135-139, 1999.

OLIVEIRA, Juarez Souza de. **Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa Orellana L.*)**. 2005.215f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, [2005].

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

QUEIROZ, Élson Augusto. **Níveis de Farelo de Urucum (*Bixa Orellana L.*) em Rações à Base de Sorgo para Poedeiras Comerciais**. 2006.38f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, Rio de Janeiro, [2006].

RABIK, C.A.; DOLAN, M.E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. **Cancer Treat. Rev.**, v.33, n.1, p.9-23, 2007.

RIOS, Alessandro de Oliveira. **Carotenóides de urucum: desenvolvimento de método analítico e avaliação da estabilidade em sistemas-modelo**. 2004.163f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, [2004].

RIOS, A. de O.; BORSARELLI, C.D.; MERCADANTE, A.Z. Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, n.6, p.2307-2311, 2005.

RIOS, Alessandro de Oliveira. Proteção de carotenóides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. **Revista Alimentos e**

Nutrição. Araraquara. V.20, n.2. p.343-350,2009.

SHAMI, Najua Juma Ismail; MOREIRA, Emilia Addison Machado. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 2, p.227-236, 2004.

STRATTON, S. P.; SCHAEFER, W. H.; LIEBLER, D. C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of β -carotene. **Chem. Res. Toxicol.** v. 6, p. 542-547, 1993.

RODRIGUEZ-AMAYA, B. B, A Guide to Carotenoid Analysis in Food, **OMNI Research, ILSI Human Nutritional Institute**, Washington, 64 pag. 2001.

ROSENBERG E VANCAMP, B.; VANCAMP, L. The Successful Regression of Large Solid Sarcoma Tumors by Platinum Compounds. **Cancer Research.**, v.30, n.6, p.1799-1802, 1970.

SANTOS, Graciela Cristina dos. **Caracterização do efeito protetor do urucum e da bixina sobre a genotoxicidade induzida pelo antitumoral Cisplatina em células de linhagem PC12**. 2008.136f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho Faculdade de ciências farmacêuticas – unesp, Araraquara [2008].

SENDÃO, M. C. et al. Comparative effects of acute and subacute lycopene administration on chromosomal aberrations induced by cisplatin in male rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 1334-1339, 2006.

SPERANZA G., MANITTO P. e MONYI D., Interaction Between Singlet Oxygen and Biologically Active Compounds in Aqueous Solution. III. Physical and Chemical 1O_2 –Quenching Rate Constants of 6, 6-Diapocarotenoids. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, 8, 51-61, 1990.

STAHL, W.; SIES, H. Physical quenching of singlet oxygen and *cis-trans* isomerization of carotenoids. **Ann. New York Acad. Sci.**, 691: 10-19, 1993.

SILVA, C.; ANTUNES, LUSANIA, M. G.; BIANCHI, M. L. P. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. **Pharmacology Research**, v. 43,p. 56, 2001.

STRATTON, S. P.; SCHAEFER, W. H.; LIEBLER, D. C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of β -carotene. **Chemical Research Toxicology**,v. 6, p. 542-547, 1993.

SCHWARTZ, S. H. **Apocarotenoids and Carotenoid Cleavage ioxxygenases.**

Disponível em <http://www.msu.edu/~schwartz1/apocarotenoids.htm>>. consultado em 23/12/2010.

SEGURO, A.C.; SHIMIZU, M.H.M.; KUDO, L.H.; ROCHA, A.S. Renal concentration defect induced by cisplatin. The role of thick ascending limb and papillary collecting duct. **Am. J. Nephrol.**, v. 9, n. 1, p. 59-65, 1989.

THERESIAMMA, K. C, GEORGGE, J. Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. **J Exp Clin Cancer Reseach**, v. 17 , p. 431–4461, 998

UOZOMI, J.; LITTERST, C.L. The effect of cisplatin on renal ATPase activity *in vivo* and *in vitro*. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 15, p. 93-96, 1985.

WEIJ, N.L.; CLETON, F.J., OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy induced toxicity. **Cancer Treat. Rev.**, v. 23, p. 209-240, 1998.

ZOPPI, Cláudio et al. Alterações em biomarcadores de Estresse Oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. **Revista Paulista de Educação Física de São Paulo**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 119-130, 2003.

ZHANG, J.G.; LINDUP, W.E. Role of mitochondria in cisplatin-induced oxidative damage exhibited by rat renal cortical slices. **Biochem. Pharmacol.**, v. 45, p. 2215-2222, 1993.

WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.4, n.4, p.307-320, 2005.

WEIJL, N.I.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treat. Rev.**, v.23, n.4, p.209-240, 1997.

YAMAUCHI, T.; KAWAI, Y.; UEDA, T. Enhanced DNA excision repair in CCRF-CEM cells resistant to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, quantitated using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. **Biochem. Pharmacol.**, v.66, n.6, p.939-946, 2003.