

Avaliação da toxicidade oral subcrônica da bixina para ratos

Ana Rita Pedreira Lapa Bautista^{1*}, Maria Spínola Miranda², Márcio Santos Batista³, Eduardo Luiz Trindade Moreira⁴, Iracema Moreira da Silva⁵, Iolanda Cirne Sena Gomes⁶

¹Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S. A. – EBDA, ²Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, ³Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia – ADAB, ⁴Laboratório de Patologia, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, ⁵Centro Médico Álvaro Lemos, Fundação José Silveira, ⁶Laboratório de Anatomia Patológica, Fundação José Silveira.

A bixina em pó (30% de bixina), proveniente das sementes de urucum (Bixa orellana L.), foi administrada, por gavagem, a ratos Wistar, 10 animais de cada sexo, na concentração de 0,01±0,006% de bixina/dia, em óleo de milho, cinco dias por semana, durante 13 semanas, com o objetivo de verificar a toxicidade da substância-teste para essa espécie animal. A grupos controle (10 animais por sexo), foi administrado óleo de milho, para comparação. Durante o período de exposição, foram registrados o peso absoluto corpóreo, o ganho de peso, o consumo de ração e a eficiência alimentar, bem como realizadas as avaliações clínica e oftalmoscópica. Antes da eutanásia, os animais foram anestesiados (éter etílico) e submetidos a exames hematológicos de rotina e bioquímicos (glicose, creatinina, colesterol total, triglicérides, asparagina transaminase e g-glutamyl transaminase). Durante o exame necroscópico, fígado, rins, baço, adrenais e testículos foram excisados e pesados. O estudo histológico foi realizado em amostras de fígado e rins dos animais expostos e respectivos controles. A análise estatística dos parâmetros de peso, hematológicos e bioquímicos mostrou algumas diferenças significativas entre os grupos teste e controle, as quais não parecem estar relacionadas à exposição. Não foram observadas alterações clínicas, comportamentais, necroscópicas e histológicas. Nas condições do estudo, a bixina não produziu efeitos tóxicos nos animais expostos.

Unitermos

- Bixina
- Bixa orellana L.
- Urucum
- Toxicidade subcrônica
- Carotenóides

*Correspondência:

A. R. P. L. Bautista
Empresa Baiana de Desenvolvimento
Agrícola S. A. – EBDA
CLA/Laboratório de Toxicologia
Av. Adhemar de Barros, 967. Ondina
40170-110. Salvador, Bahia
E-mail: ebda.cla@bahia.ba.gov.br

INTRODUÇÃO

O corante obtido do urucum participa com percentual expressivo, dentre os corantes naturais utilizados em alimentos, em função de ser constituído, principalmente, de carotenóides como a bixina (lipossolúvel), com

grande aplicação nas indústrias de massas, rações animais, produtos oleosos e, a norbixina (hidrossolúvel), em laticínios, embutidos e cereais (Giral dini, 1994).

A substituição crescente dos corantes artificiais por aqueles de origem natural exige que os dados toxicológicos disponíveis para os estudos de avaliação de risco

à saúde humana e animal sejam tão bem conhecidos quanto os dos corantes sintéticos, o que nem sempre acontece (WHO, 2000; Paumgartten, 2000). No caso da bixina, nem todos os estudos toxicológicos exigidos para a referida avaliação foram feitos ou, se o foram, necessitam ser repetidos com a inclusão de novos parâmetros, como é o caso do estudo subcrônico (WHO, 1982).

A presente avaliação foi realizada com a bixina em pó, produzida comumente pelas indústrias do setor, de forma padronizada a partir das sementes do urucum e cuja análise forneceu o teor de 30% de bixina. Teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos decorrentes da exposição subcrônica (90 dias), por via oral, em ratos de ambos os sexos, com enfoque nos parâmetros de peso, alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas, necroscópicas e histológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

A cada semana, em função da dose e do ajuste das médias de peso dos animais de cada subgrupo teste, a bixina em pó, fornecida pela Baculerê Agro Industrial Ltda (Lote 1599001), com teor de bixina de 30,03% (min. 27,00%) e umidade de 1,70% (max. 10,00%), foi misturada com óleo de milho, na proporção de 1:2, agitada periodicamente e mantida ao abrigo da luz, em frasco de vidro, hermeticamente fechado, à temperatura de aproximadamente 22 °C. A estabilidade da bixina no óleo de milho foi determinada a cada nova preparação e após a última exposição semanal, de acordo com a NBR N°18632 (ABNT, 1996).

A bixina no óleo de milho foi administrada por gavagem, cinco dias por semana, durante 13 semanas. O volume máximo administrado não excedeu a 0,5 mL/100g de peso absoluto corpóreo. Tomando por base o volume oferecido por média de peso dos animais, foi administrado 0,01±0,006% de bixina/dia.

A metodologia adotada foi baseada no teste 408 – Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents (adopted: 21st September 1998) (OECD, 1999).

Foram utilizados ratos Wistar albinos (*Rattus norvegicus albinus*), de ambos os sexos, procedentes do biotério sem barreiras da Fundação José Silveira, Salvador, Bahia.

Os 40 animais, 10 por sexo (grupo teste e grupo controle), com idade inicial de 5/6 semanas (aproximadamente 100 g de peso absoluto corpóreo), foram pesados no primeiro dia da exposição (d0) e distribuídos aleatoriamente em subgrupos de cinco, mantidos em gaiolas de propileno translúcido (40x32x16 cm), com tampa de arame zincado e cama de maravalha. Os pesos médios iniciais, entre os grupos teste e controle, não diferiram estatisticamente.

Os animais foram mantidos sob temperatura (22±0,9 °C) e umidade (76 ±5,4%) controladas, fotoperíodo de 12 horas claro/escuro. Os animais receberam, durante o estudo, ração Nuvilab CR-1 e água filtrada, ambos “ad libitum”.

Os procedimentos operacionais seguidos pelo laboratório foram fundamentados nos “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e de acordo com a Associação Americana de Medicina Veterinária (Andrews *et al.*, 1993).

De acordo com a metodologia adotada e com as atividades de rotina praticadas no Laboratório, foram realizados os procedimentos que seguem:

1. Pesagem, dos animais e da ração fornecida, a cada 7 dias; cálculos do ganho de peso e do consumo alimentar; após o período de exposição foram calculados o ganho de peso total e o ganho de peso, o consumo alimentar e a eficiência alimentar (gramas de peso corpóreo ganho para cada 100 g de ração consumida) médios;
2. Avaliação clínica (modificações na pele, pêlos, olhos, mucosas, alterações respiratórias, circulatórias e dos sistemas nervosos central e periférico) realizada diariamente, exceto nos finais de semana; avaliação de efeitos gerais (Almeida *et al.*, 1983), ou seja, alterações no estado consciente e disposição, no sistema motor, no tônus muscular, no sistema nervoso central (tremores, convulsão e sedação) e no sistema nervoso autônomo (lacrimagem, salivação, ptose, piloereção e respiração);
3. Exame oftalmoscópico realizado ao final do período de exposição (91° dia);
4. Ao final do período experimental (92° dia), os animais foram anestesiados (éter etílico) e a coleta de sangue realizada na veia porta-hepática, em animais sob jejum de aproximadamente 20 horas. Foram realizados os seguintes exames: contagem de hemáceas (Hm), concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM), contagem de plaquetas (Plaq), leucócitos, segmentados (Seg), linfócitos (Lin), monócitos (Mono) e eosinófilos (Eos) utilizando analisador automático (Coulter Counter T-890 da Coulter Electronics, INC., Hialeah, FL); e glicose, colesterol, triglicérides, asparagina transaminase, g-glutamil transaminase e creatinina utilizando analisador automático (DADE Dimension AR da DADE International INC. Newaek, DE 19714, USA);
5. Após a coleta, procedeu-se à eutanásia por aprofundamento da anestesia e à necrópsia. A avaliação

necroscópica incluiu exames externos do corpo e orifícios e das cavidades craniana, torácica, abdominal e de seus conteúdos. Durante a necrópsia, fígado, baço, rins, adrenais e testículos foram excisados e pesados. O peso relativo dos órgãos foi expresso em percentual de peso corpóreo;

6. Fragmentos de cérebro, cerebelo, hipófise, tireóide, pulmão, coração, aorta, glândula salivar, fígado, baço, adrenais, rins, pâncreas, testículo, ovário, útero, estômago, duodeno, íleo, ceco, reto, bexiga, linfonodo mesentérico, musculatura esquelética, ciático e medula óssea (fêmur) foram fixados e reservados para o caso de serem observadas alterações macroscópicas em animais pertencentes aos subgrupos avaliados em datas diferentes;
7. Estudo histológico do fígado e rins dos animais dos grupos teste e controle, considerando o envolvimento desses órgãos no metabolismo e excreção de muitos xenobióticos. Os fragmentos foram fixados em formaldeído tamponado (10%), processados, infiltrados e incluídos em parafina, laminados a 5/6 micra e corados em hematoxilina-eosina.

O teste de Bartlett foi empregado para testar a homogeneidade de variância entre os grupos teste e controle. Empregou-se ANOVA apenas para os dados com distribuição normal e o teste de Kruskal-Wallis, quando as variâncias diferiram. As diferenças entre grupos foram verificadas pelos testes “t” de Student e Mann-Witney. Os níveis de significância utilizados foram de $P < 0,05$ e $P < 0,01$ (WHO, 1991).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes preliminares mostraram que houve estabilidade na preparação da bixina no óleo de milho no intervalo de

tempo entre a preparação e a última exposição semanal.

Embora as médias de consumo de ração, dos grupos teste de machos e fêmeas, tenham diferido estatisticamente ($P < 0,01$), não foi atribuída importância biológica, considerando que as demais variáveis de peso não diferiram, especialmente, a eficiência alimentar (Tabela I).

O grupo teste de machos apresentou média de peso relativo de adrenais significativamente superior ($P < 0,01$), quando comparada à do grupo controle (Tabela II).

Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) em hemáceas, hemoglobina e hematócrito do grupo teste de machos e na concentração de hemoglobina globular média ($P < 0,01$), do grupo teste de fêmeas (Tabela III).

No grupo teste de fêmeas, as médias de AST e glicose diferiram significativamente ($P < 0,05$) (Tabela IV).

Os exames necroscópicos dos animais dos grupos teste e controle não revelaram alterações na mucosa gástrica e nos demais órgãos e tecidos examinados. Os dois óbitos em fêmeas não foram relacionados a efeitos tóxicos e, sim, por trauma durante a introdução da sonda. O estudo microscópico do fígado e rins de animais de ambos os sexos não revelou alterações.

As diferenças estatisticamente significativas observadas em alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos não parecem estar associadas a efeito tóxico, considerando-se que se encontraram dentro das faixas de normalidade para os referidos parâmetros do controle histórico do laboratório (Tabela V) e aquelas apresentadas por Harkness e Wagner (1985). As diferenças observadas entre os valores de hemáceas, hemoglobina e hematócrito dos grupos teste de machos, embora muito discretas e dentro das faixas de normalidade mencionadas, podem sugerir ação hemolítica, que não pode ser excluída por não terem sido avaliados reticulócitos e bilirrubina bem como o transporte de ferro.

TABELA I - Médias e desvios padrão do ganho de peso total (GPt), do ganho de peso (GP), do consumo de ração (CR) e da eficiência alimentar (EA) médios, de ratos machos e fêmeas expostos, por via oral, à concentração de $0,01 \pm 0,006\%$ de bixina/dia e respectivos controles

Sexo	Machos		Fêmeas	
	Teste	Controle	Teste	Controle
Parâmetros				
N	10	10	08	10
GPt	228,6±16,79	222,9±35,14	115,7±11,00	122,7±10,68
GP	17,6±1,29	17,1±2,70	8,9±0,84	9,4±0,82
CR	794,2±10,28*	771,2±10,28	547,6±7,16*	590,5±10,82
EA	2,2±0,19	2,3±0,39	1,5±0,15	1,5±0,14

N = número de animais; * $P < 0,01$ comparado ao grupo controle

TABELA II - Médias e desvios padrão do peso relativo de órgãos de ratos machos e fêmeas expostos, por via oral, à dose de 0,01±0,006% de bixina/dia e respectivos controles

Sexo	Machos		Fêmeas	
	Teste	Controle	Teste	Controle
Grupos				
Órgãos				
N	10	10	08	10
Fígado	3,0±0,11	2,8±0,17	2,8±0,15	2,7±0,06
Rins	0,6±0,05	0,6±0,06	0,6±0,03	0,6±0,06
Adrenais	0,02±0,003*	0,01±0,005	0,03±0,007	0,03±0,005
Testículos	0,8±0,08	0,7±0,22	-	-
Baço	0,2±0,05	0,1±0,05	0,2±0,00	0,2±0,00

N = número de animais; * $P < 0,01$ comparado ao grupo controle

TABELA III - Médias e desvios padrão dos valores hematológicos de ratos machos e fêmeas expostos, por via oral, à concentração de 0,01±0,006% de bixina/dia e respectivos controles

Sexo	Machos		Fêmeas	
	Teste	Controle	Teste	Controle
Grupos				
Parâmetros				
N	10	10	08	10
Hm ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8,5±0,30*	8,8±0,39	7,7±0,38	7,8±1,06
Hb (g/dL)	16,0±0,61*	16,7±0,67	14,6±0,57	15,9±0,48
Ht (%)	45,4±1,67*	47,1±1,86	41,8±1,50	44,5±1,16
VGM (fl)	53,6±0,73	53,2±0,52	54,4±1,06	54,6±1,00
HGM (pg)	18,1±2,58	18,9±0,20	19,9±0,48	19,5±0,46
CHGM (g/dL)	35,3±0,56	35,5±0,23	35,1±0,57**	35,8±0,28
Leu ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	4,9±0,99	5,4±0,83	4,5±0,85	4,1±0,68
Seg (%)	22,6±4,97	20,6±4,97	19,4±4,66	21,8±4,49
Lin (%)	73,0±5,18	75,6±5,04	75,9±6,98	73,9±5,42
Mono (%)	2,7±1,57	2,6±1,78	1,2±0,46	2,1±1,29
Eos (%)	1,7±1,57	1,2±1,32	3,5±3,29	2,2±1,40
Pla(x $10^3/\text{mm}^3$)	1051,0±63,97	1245,0±168,40	1107,9±80,96	1191,5±111,91

N = número de animais; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ comparado ao grupo controle

TABELA IV - Médias e desvios padrão dos valores bioquímicos plasmáticos de ratos machos e fêmeas expostos, por via oral, à concentração de 0,01±0,006% de bixina/dia e respectivos controles

Sexo	Machos		Fêmeas	
	Teste	Controle	Teste	Controle
Grupos				
Parâmetros				
N	10	10	08	10
AST (μL)	43,8±5,59	47,8±5,59	39,0±1,00*	43,4±2,37
Glicose (mg/dL)	71,7±9,18	75,5±10,32	74,7±14,65*	57,6±13,48
Gama GT (μL)	1,8±0,92	2,0±1,56	2,2±1,16	2,8±1,81
Creatinina (mg/mL)	0,2±0,06	0,2±0,08	0,3±0,10	0,3±0,10
Colesterol (mg/dL)	40,2±3,85	42,7±3,50	41,1±4,45	40,2±6,30
Triglicérides (mg/dL)	33,4±8,34	33,4±7,12	22,9±7,47	23,0±11,27

N = número de animais; * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle

TABELA V - Faixas de normalidade para alguns parâmetros do controle histórico (1992-2000)*

Sexo/Parâmetros	Faixas de normalidade
MACHOS	
Adrenais (%)	0,01 – 0,04
Hm (x10 ⁶ /mm ³)	6 – 9
Hb (g/dL)	11 – 17
Ht (%)	37 – 49
FÊMEAS	
CHGM (g/dL)	33 – 37
AST (u/L)	33 – 77
Glicose (mg/dL)	26 – 112

*Faixas obtidas a partir das médias das determinações de aproximadamente 300 animais.

O estudo oftalmoscópico dos animais de ambos os sexos, dos grupos teste e controle, não mostrou alterações.

Para concluir, observou-se que a exposição à bixina em pó, por via oral, na concentração de 0,01±0,006% de bixina/dia, por um período de 90 dias, não produziu, em ratos machos e fêmeas, alterações clínicas, de efeitos gerais, necrscópicas e histológicas. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos teste e controle segundo o protocolo utilizado. Assim, sob as condições do estudo, a bixina não produziu efeitos tóxicos nos animais expostos.

AGRADECIMENTOS

À Baculerê Agroindustrial Ltda, pela amostra de bixina em pó utilizada no estudo. Ao Núcleo de Corantes Naturais da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, e à Fundação José Silveira, pelo suporte financeiro para a realização dos exames hematológicos, bioquímicos e preparação das lâminas para o estudo microscópico.

ABSTRACT

Oral toxicity assessment of annatto in rats

The aim of the investigation was to determine the possible health hazards of bixin (30%) from annatto (Bixa orellana L.) origin to rats. A concentration of 0.01±0.006%/day of bixin in corn oil was administered to 20 Wistar rats (10 per sex), through the oral route (gavage) over a period of 13 weeks. A group of untreated animal (10 per sex) acting as a control (corn oil) was used for comparison. Body weight, body weight gain, feed consumption and feed efficiency were determined. The health of the animals was checked. At the end of the study a biochemistry (glucose, creatinine, total cholesterol, triglyceride, asparagine

transaminase and g-glutamyl transaminase) and hematological examination was carried out. All the animals were subjected to a gross-pathological assessment followed by liver, kidney, adrenals, spleen and tests weight. A histopathological analysis (liver and kidney) was performed. From the weight parameters clinical, clinical chemistry and haematology, necroscopy and histology viewpoints, it can be said that annatto, under the chosen test condition, was no toxic to the rat.

UNITERMS: Bixin. Annatto. Bixa orellana L. Subchronic Toxicity. Carotenoids.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, R.N.; ALMEIDA, J.A.; LACET, M.A.A.; THOMAS, G. Triagem farmacológica de plantas do nordeste brasileiro. In: SIMPÓSIO DE PRODUTOS NATURAIS, 2., 1983. *Anais*. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, Ed. Universitária, 1983. p.345-356.
- ANDREWS E.J.; BENNET B.T.; CLARK J.D. Report on the AVMA panel on euthanasia. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, v. 202, p. 230-247, 1993.
- OECD. 408 – Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. In: *OECD Guidelines for testing of chemicals*. Paris: OECD, 1999. p.1-10.
- GHIRALDINI, E. Corantes naturais mais comumente utilizados na indústria de alimentos. *Rev. Bras. Cor. Nat.*, v.2, n.1, p.83-87, 1994.
- HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. *Biologia e clínica de coelhos e roedores*. São Paulo: Roca, 1985. 230 p.
- PAUMGARTTEN, F.J.R. Toxicologia de corantes naturais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CORANTES NATURAIS, 4., 2000. *Anais*. João Pessoa: Sociedade Brasileira de Corantes Naturais, 2000. p.25.
- WHO. International Programme on Chemical Safety-IPCS (Switzerland). Toxicological evaluation of certain food additives. Geneva, 1982. 355 p.
- WHO. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Evaluation of natural assessments of intake of annatto extracts (bixin). Geneve, 2000. n.44, p. 485-492 (Food Additive Series).
- Recebido para publicação em 02 de dezembro de 2002.