UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Caracterização e aplicação de nanodispersão de bixina

RAFAEL TERUITI DE OLIVEIRA TAKAMOTO

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

> Orientadora: Profa. Dra. Irene Satiko Kikuchi

São Paulo 2015 UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Caracterização e aplicação de nanodispersão de bixina

RAFAEL TERUITI DE OLIVEIRA TAKAMOTO

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

> Orientadora: Profa. Dra. Irene Satiko Kikuchi

São Paulo 2015 Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Takamoto, Rafael Teruiti de Oliveira

 T136c Caracterização e aplicação de nanodispersão de bixina / Rafael Teruiti de Oliveira Takamoto. -- São Paulo, 2015. 87p.

> Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Kikuchi, Irene Satiko

> 1. Medicamento : Controle de qualidade I. T. II. Kikuchi, Irene Satiko, orientador.

615.19 CDD

Rafael Teruiti de Oliveira Takamoto

CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE NANODISPERSÃO DE BIXINA Versão Original

> Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção de grau de Mestre

> > Profa. Dra. Irene Satiko Kikuchi Orientador/Presidente

> > > 1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

AGRADECIMENTOS

À Profa. Irene Satiko Kikuchi, por transmitir seus conhecimentos e experiências e pela orientação nos caminhos da pesquisa científica.

À Profa. Ana Maria Carmona-Ribeiro e ao técnico Rodrigo Ribeiro pela contribuição nos ensaios de determinação de tamanho de partícula, no início deste projeto.

À Profa. Denise Freitas Siqueira Petri, pelo uso de suas instalações nos ensaios de tensiometria.

À Profa. Iolanda Midea Cuccovia e a técnica Márcia Aparecida da Silva, pelo uso do Zeta sizer.

A Profa. Nádia Araci Bou-Chacra e ao mestrando Iván Andrés Córdova Morales, por uso de seus equipamentos e me acompanhar nos ensaios de determinação de tamanho de partícula.

Ao Prof. Ronaldo Domingues Mansano e ao Dr. Adir José Moreira, pelas análises por microscopia eletrônica de varredura.

À Dra. Miriam Cristina Sakuragui Matuo, pelo convívio e treinamento em cultura celular.

Aos professores do Laboratório de Controle Biológico de Qualidade, Profa. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, Profa. Telma Mary Kaneko e Prof. Felipe Rebello Lourenço.

Aos companheiros de laboratório Wesley Anderson Oliveira, José Sousa Sobrinho, Paulo Kiyoshi Yshico, pelo convívio e discussões enriquecedoras.

Aos membros do Laboratório de Controle de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários e Produtos Afins e as Respectivas Matérias-Primas – CONFAR, por pela solicitude e gentileza demonstrada em várias etapas deste projeto. À CORANTEC Corantes Naturais LTDA pela gentil doação dos extratos de sementes de urucum.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo auxílio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela colaboração e atenção.

RESUMO

TAKAMOTO, R.T.O. **Caracterização e aplicação de nanodispersão de bixina. Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

A bixina é o principal carotenoide encontrado na superfície externa das sementes de *Bixa orellana* L., conhecida popularmente como urucum. Os extratos das sementes são largamente utilizados, tradicionalmente como condimento e no preparo de "remédios" caseiros para diversos tipos de doenças e sintomas. Industrialmente, é empregado em formulações farmacêuticas, cosméticos e alimentos como corante de origem natural. Contudo, o uso da bixina ainda é limitado pela sua baixa solubilidade em água.

Foi observado que a bixina pode ser dispersa em água, por meio de técnica já patenteada pelo nosso grupo, sem uso de suportes e adjuvantes. O presente projeto teve por objetivo obter a bixina purificada de um extrato comercial de semente de urucum, preparar e caracterizar a dispersão de bixina em água e aplicá-la como um carreador de fármacos, utilizando daunorrubicina como modelo e que é utilizada no tratamento de tumores.

*B*ixina foi obtida com 95% de pureza, a partir do extrato de semente de urucum e dispersões a partir deste composto foram preparadas em soluções aquosas e estabilizadas em cerca de duas horas. Foi determinado que a dispersão em água é constituída por partículas esféricas, com diâmetro médio variando de 20 a 150 nm e potencial Zeta de -24,7 mV.

A dispersão manteve-se estável quando submetida a concentrações de NaCl de até 50 mmol/L e resistente em pH ácido. Porém, a partir de pH=10, ocorreu hidrólise do éster metílico da bixina, convertendo-a em norbixina.

As partículas de bixina foram capazes de incorporar o fármaco daunorrubicina, em proporção molar máxima de bixina/daunorrubicina de 2:1. Nas concentrações testadas, a incorporação da daunorrubicina à dispersão de bixina causou aumento na atividade antiproliferativa, sendo até 60% mais ativa do que a daunorrubicina livre, na concentração de 1 µg/mL.

A dispersão de bixina apresentou tolerância a variações em pH e concentração salina e capacidade de incorporar e aumentar a atividade do fármaco daunorrubicina. Sendo assim, constitui-se em um potencial sistema carreador de fármaco derivado de um produto natural.

Palavras-chave: bixina, nanodispersão, carreador.

ABSTRACT

TAKAMOTO, R.T.O. Characterization and application of bixin nanodispersion.

Thesis (Masters) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2015

Bixin is a carotenoid found on surface of *Bixa orellana* L. seeds, known as annatto. Annatto seeds extracts are popularly used as a condiment for foods and remedy for several diseases and symptoms. It is also applied in pharmaceutical products, cosmetics and food industry as a natural colorant. Nevertheless, the use of bixin is still limited by its poor solubility in water.

Our research group has developed and patented a technique to disperse bixin in water, with no use of stabilizers or scaffolds.

In this project, we aimed to obtain purified bixin from commercial annatto seeds extracts, prepare and characterize a dispersion of bixin in water and to employ it as a drug delivery system. Daunorubicin was chosen as a drug model to be delivered by bixin dispersion.

Bixin was isolated from extracts in 95% purity. Aqueous dispersions of bixin demonstrated to be stable two hours after preparation. Bixin formed spherical particles with mean diameter ranging from 20 to 150 nm and Zeta potential of -24,7 mV. The dispersion was stable in NaCl solution up to 50 mMol/L and resistant to acidic medium. However, above pH=10, hydrolysis of ester termination begins to occur, converting bixin into to norbixin and since norbixin is water-soluble, the particles dissolved in water.

Bixin dispersion was able to incorporate daunorubicin, in a bixin:daunorubicin molar proportion of 2:1. In all tested concentrations, daunorubicin delivered by bixin showed higher antiproliferative activity compared to free drug, reaching 60% more activity at $1 \mu g/mL$

In conclusion, bixin dispersion showed good stability in large range of pH and salt concentrations, ability to incorporate daunorubicin and enhanced the antitumoral activity. Thus, it can be considered a potential drug delivery system derived from a natural product.

Keywords: bixin, nanodispersion, drug carrier.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURA MOLECULAR DA BIXINA11
FIGURA 2. ESTRUTURAS MOLECULARES DOS PRINCIPAIS ISÔMEROS DE BIXINA
FIGURA 3. ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE BIXINA EM CLOROFÓRMIO. DESTAQUE PARA AS REGIÕES UTILIZADAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DOS ISÔMEROS. OBS.: H – ALTURA 17
Figura 4. Micrografia ótica de cristais de bixina em acetona. Aumento de 400 vezes
FIGURA 5. CURVA DSC DA FUSÃO DA BIXINA, NA RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 6 °C/MIN23
FIGURA 6. CURVAS DSC DA BIXINA NA RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 6 °C/MIN, ANTES E APÓS RESFRIAMENTO
FIGURA 7. ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE BIXINA EM CLOROFÓRMIO E MÁXIMOS DE ABSORÇÃO.
FIGURA 8. CROMATOGRAMA DE BIXINA OBTIDA NA PURIFICAÇÃO. TEMPO DE CORRIDA: 25 MINUTOS
FIGURA 9. DISPERSÃO BIXINA. (A) DISPERSÃO IMEDIATAMENTE APÓS A INJEÇÃO30
FIGURA 10.ESPECTROS DE VARREDURA OBTIDOS PARA A DISPERSÃO DE BIXINA AO LONGO DE 180 MINUTOS. (A) VISUALIZAÇÃO GERAL DOS ESPECTROS NO PERÍODO TOTAL DE OBSERVAÇÃO. ESPECTROS OBTIDOS NOS TEMPOS DE (B) 1 A 10 MINUTOS, (C) 10 A 40 MINUTOS, (D) 40 A 180 MINUTOS
FIGURA 11. MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE BIXINA I. APLICAÇÃO DE AMOSTRA PELO MÉTODO DE EVAPORAÇÃO DE GOTA. AUMENTO DE 40000 E 150000 VEZES, RESPECTIVAMENTE, ESQUERDA E DIREITA
FIGURA 12. MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE BIXINA II. APLICAÇÃO DE AMOSTRA POR IMERSÃO DA LÂMINA. AUMENTO DE 20.000 (ESQUERDA) E 80.000 VEZES (DIREITA)
FIGURA 13. VISUALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE BIXINA EM SOLUÇÃO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE NTA – NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS
FIGURA 14. RELATÓRIO DE ANÁLISE GERADO PELO SOFTWARE PARA A AMOSTRA DE BIXINA 37
FIGURA 15. ANÁLISE DE TAMANHO DE PARTÍCULAS DA DISPERSÃO DE BIXINA

FIGURA 16. ANÁLISE DE POTENCIAL ZETA DAS PARTÍCULAS DA DISPERSÃO DE BIXINA38
FIGURA 17. PERFIS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DE VESÍCULAS DE BIXINA EM SOLUÇÕES DE NACL. EM (A), DISPERSÃO FOI FORMADA DIRETAMENTE EM SOLUÇÃO SALINA. EM (B), A DISPERSÃO FOI PREPARADA EM ÁGUA E POSTERIORMENTE DILUÍDA EM SOLUÇÃO SALINA.
FIGURA 18. ASPECTO DAS DISPERSÕES DE BIXINA EM SOLUÇÕES DE NACL DE 1 MMOL/L A 300 MMOL/L
FIGURA 19. ESPECTROS DE BIXINA OBTIDOS EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DE PH. NA LEGENDA,
ESTÃO RELACIONADOS O PH DAS DISPERSÕES DEPOIS DA INJEÇÃO DE BIXINA, ENTRE PARÊNTESES O PH ORIGINAL42
FIGURA 20. ESPECTROS DE BIXINA OBTIDOS EM DIFERENTES VALORES DE PH (ESQUERDA) E ABSORÇÃO A 390 NM DE CADA DISPERSÃO (DIREITA)
FIGURA 21. ESPECTROS DE BIXINA APÓS DILUIÇÃO EM SOLUÇÕES NOS EXTREMOS DE PH44
FIGURA 22. ESPECTROS DE ABSORÇÃO DE BIXINA EM ÁGUA, NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE 1 A 50 µMOL/L
Figura 23. Absorção a 406 nm e 530 nm de bixina em água, na faixa de concentração de 1 a 50 $\mu \text{MOL}/L46$
FIGURA 24. TENSÃO SUPERFICIAL DE DISPERSÕES DE BIXINA NAS CONCENTRAÇÕES DE 2,5 A 40 µMOL/L
FIGURA 25. CONDUTIVIDADE DE DISPERSÕES DE BIXINA NAS CONCENTRAÇÕES DE 2,5 A 40 µMOL/L
FIGURA 26. VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM A549 APÓS SER SUBMETIDA A 24 HORAS DE
IN I ERAÇAO COM AS PREPARAÇOES DE DAUNORRUBICINA
FIGURA 27. ESTRUTURA MOLECULAR DA DAUNORRUBICINA

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE BIXINA PELOS F	PRECIPITADOS
OBTIDOS	19
TABELA 2. TEMPERATURA DE FUSÃO DE BIXINA OBTIDA POR DSC EM	FUNÇÃO DE
DIFERENTES TAXAS DE AQUECIMENTO	22
TABELA 3. COMPARAÇÃO DOS DADOS ESPECTRAIS DA BIXINA OBTIDOS EXPERIM	/ENTALMENTE
COM OS VALORES ENCONTRADOS NA LITERATURA	29
TABELA 4. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE DAUNORRUBICINA NAS DIS	PERSÕES DE
BIXINA	51

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. ESTUDOS IN VITRO SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E GENOPROTETORA	۹ DA
BIXINA	12
QUADRO 2. ESTUDOS IN VIVO SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E GENOPROTETORA	N DA
BIXINA	13
Quadro 3. Estudos sobre a bixina e sua capacidade indutora de enzimas	DE
METABOLIZAÇÃO	16
QUADRO 4. FORMULAÇÕES NANOTECNOLÓGICAS DE BIXINA	14
QUADRO 5. PONTOS DE FUSÃO DE BIXINA RELATADOS NA LITERATURA	21
QUADRO 6. COEFICIENTES DE EXTINÇÃO DE BIXINA EM CLOROFÓRMIO	26

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- CAC Concentração de Agregação Crítica, do inglês Critical Aggregation Concentration
- CMC Concentração Micelar Crítica, do inglês *Critical Micelle Concentration*
- DLVO Iniciais dos pesquisadores Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek, idealizadores da teoria DLVO.
- nm Nanômetro, ou 10⁻⁹ metro.
- mV mili Volt, ou 10⁻³ Volt
- DOTAP N-[1-(2,3-dioleil)propil]-N,N,N-trimetilamônio
- DODAB brometo de dioctadecildimetilamônio
- DSC Calorimetria Exploratória Diferencial, do inglês Differential Scanning Calorimetry
- UV-Vis Ultravioleta-visível
- E_1^{1cm} Coeficiente de extinção de determinada entidade química em solução a 1% (m/v), para caminho ótico de 1 cm.
- λ Comprimento de onda
- °C Grau Celsius
- NTA Análise de Rastreamento de Nanopartículas, do inglês Nanoparticle Tracking Analysis.
- NaCl Cloreto de sódio
- NaOH Hidróxido de sódio
- HCI Ácido clorídrico

SUMÁRIO

1	INTRC	DUÇÃO 10
	1.2 RE	VISÃO DA LITERATURA 13
	1.2.1	Considerações inicias 13
	1.2.2	Bixina14
	1.2.3	Estrutura química 14
	1.2.4	Caracterização 16
	1.2.5	Atividade biológica de bixina17
	1.2.6	Atividade antioxidante18
	1.2.7	Efeitos da bixina no metabolismo14
	1.2.8	Metabolização da Bixina15
	1.2.9	Formulações Nanotecnológicas de Bixina 17
2	JUSTI	FICATIVA E OBJETIVO 14
3	MATE	RIAL E MÉTODOS 15
	3.1 Ma	ıterial 15
	3.2 Mé	todos 15
	3.2.1	Obtenção de bixina a partir de matéria-prima obtida no mercado 15
	3.2.2	Determinação de ponto de fusão16
	3.2.3	Análise por Calorimetria Exploratória Diferencial16
	3.2.4	Espectrofotometria16
	3.2.5	Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 17
	3.2.6	Preparação da dispersão de bixina17
	3.2.7	Efeito do pH no preparo e estabilidade da dispersão 17
	3.2.8 dispers	Efeito da concentração de NaCl no preparo e estabilidade da são
	3.2.9	Aplicação da dispersão de bixina para carreamento de fármaco
	anitum	oral (daunorrubicina)18

4	RESUL	TADOS E DISCUSSÃO 19
2	4.1 Ob	tenção de Bixina 19
	4.1.1	Purificação de bixina19
	4.1.2	Análise da bixina21
	4.1.3	Identificação do isômero de bixina28
2	4.2 Ca	racterização da dispersão de bixina29
	4.2.1	Preparo da dispersão29
	5.2.2	Microscopia eletrônica de varredura34
	4.2.3	Determinação do diâmetro da partícula
	4.2.4	Efeito do NaCl sobre o preparo e estabilidade da dispersão de
	bixina	39
	4.2.5	Efeito do pH sobre o preparo e estabilidade da dispersão de bixina 41
	4.2.6	Determinação da concentração crítica de agregação daspartículas
	de bixi	na
	4.2.7	Aplicação da dispersão de bixina como carreadora do fármaco
	daunor	rubicina
5	CONC	LUSÕES 53
6	PERSF	PECTIVAS
RE	FERÊN	CIAS BIBLIOGRÁFICAS
AN	IEXOS	

1 INTRODUÇÃO

O carotenóide bixina é o componente majoritário do pigmento que recobre a superfície externa das sementes de *Bixa orellana* L. Aproximadamente 80% do pigmento é constituído de α -bixina, um monometiléster do ácido carboxílico da α -norbixina (FERREIRA et al., 1999). As estruturas moleculares da bixina e da norbixina estão representadas na figura 1.

Os extratos das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) são largamente utilizados como condimentos alimentares, conhecidos como "colorau" ou "colorífico" e também são amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e, principalmente, alimentícia (DE-OLIVEIRA et al., 2003). Popularmente, as sementes de *B. orellana* têm sido utilizadas no preparo de "remédios" para as mais variadas aplicações, como poções afrodisíacas, tratamento de febres, inflamações, doenças parasitárias e diabetes mellitus (PAUMGARTEN et al., 2002).

Em estudos realizados tanto com extratos das folhas (IROBI; MOO-YOUNG; ANDERSON, 1996) quanto das sementes (GALINDO-CUSPINERA; WESTHOFF; RANKIN, 2003; GALINDO-CUSPINERA; RANKIN, 2005), foi verificado um efeito inibitório de crescimento contra uma variedade de microrganismos, entre eles *Neisseria gonorrhoea*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. Entretanto, foi observada pouca ou nenhuma atividade contra fungos. A fração volátil apresentou vários mono e sesquiterpenos, e outros compostos solúveis em água com atividade antimicrobiana.

A bixina possui atividade antioxidante (CHISTÉ et al., 2011). O efeito protetor conferido pela atividade antioxidante contra agentes mutagênicos foi investigado por diversos autores. Foi reportada redução na produção de espécies reativas de oxigênio por cisplatina (RIOS et al, 2009; ANTUNES et al., 2005), benzo[a]pireno e doxorrubicina (BARCELOS et al., 2009), 1,2-dimetilhidrazina (OLIVEIRA et al., 2013) além de proteção contra o *stress* oxidativo (KIOKIAS;GORDON, 2003).

A bixina também parece ter uma ação reguladora do metabolismo de lípides e glicose, segundo alguns estudos mais recentes. ROEHRS e colaboradores (2014) trataram ratos diabéticos (indução por estreptozotocina)

10

com bixina a 10 mg/kg de massa corporal por 30 dias. Os animais apresentaram níveis de colesterol e triglicérides normais, além de menores níveis glicêmicos que os não-tratados.

Em estudo realizado com ratos (PAUMGARTEN et al, 2002), não foi observada toxicidade até a ingestão diária de bixina 140mg/kg. Destaca-se que este valor corresponde a cerca de 2000 vezes o valor para a ingestão diária aceitável para humanos, de 0,065mg/kg peso/dia (JECFA, 1982).



Figura 1. Estruturas moleculares de bixina (acima) e norbixina (abaixo).

As propriedades farmacológicas da bixina e também dos outros componentes dos extratos de urucum podem ser exploradas no desenvolvimento de novos fármacos e também como adjuvantes em formulações farmacêuticas, cosméticas, em alimentos, vacinas, entre outros. No entanto, a baixa solubilidade e instabilidade se impõem como um grande desafio (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

No esforço para superar estas limitações, diversas formas de carreamento de bixina têm sido desenvolvidas, como ciclodextrinas (LYNG;PASSOS;FONTANA, 2005), microencapsulação com quitosana (PARIZE et al. 2008), nanocápsulas poliméricas (BOSCHETTO et al., 2014; LOBATO et al., 2013), nanopartículas lipídicas (RAO et al, 2014) e microcápsulas proteicas (ZHANG e ZHONG, 2013). Os sistemas de carreamento em geral baseiam-se em imobilizar a molécula de bixina sobre um suporte hidrossolúvel ou envolver as moléculas com uma matriz (geralmente polimérica).

Porém, em estudos anteriores (TAKAMOTO; MATUO; KIKUCHI, 2012; KIKUCHI et al., 2012), foi verificado que a bixina pode ser dispersa em água, sem uso de dispersantes ou suportes, por método desenvolvido pelo grupo e em processo de patenteamento. As moléculas de bixina, quando em ambiente aquoso, se auto-associam em estruturas esféricas em escala nanométrica.

Esta auto-organização ocorre guiada por componentes termodinâmicos e entrópicos, com a finalidade de minimizar a interação entre as cadeias apolares e as moléculas do solvente aquoso, uma vez que essas interações são desfavoráveis (ISRAELACHVILI, 2011).

Estas partículas de bixina são as primeiras constituídas integralmente por um carotenóide, enquanto a literatura relata o uso apenas como agente estabilizador (HARA et al, 2008) ou modificador das propriedades de membrana (SOCACIU; LAUSCH; DIEHL, 1999). O método de dispersão de bixina desenvolvido por nosso grupo encontra-se em processo de patenteamento, sob o protocolo "P. I. 0.903.009-3" de 31.08.09.

Fármacos com baixa solubilidade em água podem ser incorporados à nanodispersão de bixina. Um dos desafios enfrentados na terapia medicamentosa são fármacos que apesar de possuírem boa atividade contra o alvo terapêutico, têm aplicação limitada devido à baixa solubilidade, tornando necessário o uso de doses elevadas ou veículos oleosos, aumentando o risco de efeitos adversos (ALI et al. 2011).

A incorporação de fármacos nas partículas encontra uma aplicação especialmente útil no carreamento de fármacos antitumorais. De acordo com o método e as condições de preparo, características como tamanho e potencial Zeta, podem ser controladas. Desta forma, é possível obter partículas que explorem o Efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentadas, do inglês *EPR effect – Enhanced Permeability and Retention effect*. Este é um fenômeno observado em vasos sanguíneos em regiões próximas a tumores sólidos, que apresentam uma maior permeabilidade a partículas em relação ao tecido sadio.

Portanto, uma vez que as partículas não são filtradas no glomérulo, ao longo do tempo elas tendem a se acumular no tecido tumoral, onde liberam o fármaco (FANG;NAKAMURA;MAEDA, 2011). Isto permite usar doses menores do medicamento, e ao mesmo reduzir efeitos adversos e aumentar a eficácia.

Como vantagem, além de sua origem natural, não foram encontradas informações na literatura que ateste toxicidade da bixina, o que a torna uma alternativa aos lipídeos sintéticos comumente utilizados na obtenção de nanopartículas, como cloreto de N-[1-(2,3-dioleil)propil]-N,N,N-trimetilamônio (DOTAP), brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), entre outros (FILION; PHILLIPS, 1997; LV et al., 2006).

Este estudo teve por objetivo obter e caracterizar uma nanodispersão de bixina, composto isolado a partir do extrato de sementes de urucum e avaliar sua aplicabilidade como carreador de fármacos. Para tanto, foi estabelecido um método de purificação e identificação de bixina. A caracterização da dispersão de bixina foi realizada avaliando sua morfologia, formação e resistência a ampla faixa de pH e concentração de NaCl.

A capacidade de incorporação de fármacos foi avaliada utilizando a daunorrubicina como modelo. Em virtude de seu próprio mecanismo de ação, este fármaco apresenta elevada toxicidade, que pode ser minimizada com a incorporação do fármaco em nanopartículas (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011). A daunorrubicina é um antitumoral da família das antraciclinas e age por intercalação no DNA, impedindo a replicação e transcrição do material (GEWIRTZ, 1999). Atualmente estão disponíveis formulações comerciais lipossomais de daunorrubicina, como DaunoXome®.

Para avaliar a eficácia do sistema de daunorrubicina em dispersão de bixina, foi utilizada a linhagem A549, oriunda de carcinoma de pulmão humano.

1.2 REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1 Considerações inicias

A bixina é uma molécula bastante estudada, tanto em relação às suas características físico-químicas quanto sua aplicação como corante alimentar (SCOTTER, 2009). Foi um dos primeiros carotenóides para o qual foi relatada a estereoisomeria (ZECHMEISTER & ESCUE,1944). Todavia, poucos estudos investigaram a ação farmacológica ou desenvolveram novas formas de utilizála, seja na indústria alimentícia, farmacêutica ou cosmética. Há um grande potencial, porém, pouco explorado, uma vez que o Brasil é maior produtor de urucum, respondendo por 57% da produção mundial. Desta forma, nesta revisão foram compiladas as principais produções científicas relacionadas à bixina que a colocam em um contexto de aplicação mais amplo, que fogem ao uso apenas como corante, com intenção de despertar ou aumentar o interesse dos pesquisadores nesta área.

1.2.2 Bixina

A bixina é um apocarotenóide encontrado nas sementes de *Bixa orellana* L, popularmente conhecida como "urucum". É a principal responsável por conferir a coloração avermelhada às sementes. Embora os pigmentos do urucum sejam constituídos em sua maioria (cerca de 80%) de bixina, outros carotenóides também estão presentes, como Apo-ψ-caroteno, beta-caroteno, criptoxantina, zeaxantina, fitoeno, luteína, geranil geraniol, entre vários outros (BARBOSA-FILHO, 2006).

Os extratos das sementes de urucum podem ser tanto lipossolúveis quanto hidrossolúveis. No primeiro caso, os pigmentos são extraídos com a ajuda de substâncias apolares, em geral óleos comestíveis. No segundo, é realizada uma extração com solução de pH elevado. Isto causa uma reação de hidrólise no metil éster da bixina, convertendo-a em norbixina. Esta possui características corantes semelhantes à da bixina, porém, é hidrossolúvel.

Os extratos das sementes de *Bixa orellana* são largamente utilizados como corante nas indústrias alimentícia, sob o nome de "colorau" ou "colorífico" (DE-OLIVEIRA et al., 2003). Mais recentemente, têm crescido o uso nas indústrias farmacêutica e cosmética.

1.2.3 Estrutura química

A bixina possui uma cadeia carbônica composta por nove duplas ligações conjugadas, que terminam em um ácido carboxílico ou em um éster metílico. Na posição 9' a dupla ligação pode assumir a configuração *cis* ou *trans*, como ilustra a Figura 2.

14



Figura 2. Estruturas moleculares dos principais isômeros de bixina.

Neste sistema conjugado, os elétrons π estão altamente delocalizados, tornando o estado excitado com uma energia relativamente baixa. Desta forma, a energia necessária para provocar a transição dos elétrons $\pi \rightarrow \pi^*$ corresponde à energia das ondas eletromagnéticas de comprimento de onda na região do visível. A bixina produz soluções que variam do amarelo a um laranjaavermelhado (SCOTTER, 2009).

A *cis*-bixina é uma forma mais instável da bixina, sofre isomerização quando em solução ou exposta a luz ou calor, convertendo-se em *trans*-bixina. Por essa razão, ao longo da história a *cis*-bixina foi denominada de α -bixina e bixina lábil, por oposição à *trans*-bixina, chamada de β -bixina, bixina estável ou ainda, isobixina (ZECHMEISTER e ESCUE, 1944).

Cabe ressaltar que a bixina é um caso incomum no grupo dos carotenoides, pois ocorre naturalmente na conformação *cis*. Devido à maior estabilidade, os carotenóides são encontrados na natureza majoritariamente na configuração *trans*.

A degradação e isomerização ocorrem, sobretudo, quando há contato com a luz. NAJAR;BOBBIO E BOBBIO e seus colaboradores (1988), determinaram que a incidência luminosa é o fator preponderante na degradação da bixina, com efeito muito mais pronunciado do que contato com oxigênio do ar. Posteriormente, RIOS;BORSARELLI E MERCADANTE (2005), descreveram a cinética de degradação da bixina, na qual a isomerização é uma etapa crítica.

1.2.4 Caracterização

A bixina foi isolada pela primeira vez em 1825, por BOUSSINGAULT (1825). Mesmo assim, sua estrutura só foi elucidada completamente em 1961, por meio de análises de Ressonância Magnética Nuclear realizadas por BARBER e colaboradores (1961). A controvérsia enfrentada na caracterização da bixina deveu-se em parte à isomerização da bixina e a formação de produtos de degradação, que ocorrem durante a manipulação do composto.

A bixina pode ser facilmente analisada por espectrofotometria na faixa do ultravioleta-visível. Como é típico dos carotenóides, o sistema de duplas ligações conjugadas confere uma alta absortividade no intervalo 300-500 nm. Seu pico de absorção ocorre a 470 nm quando solubilizada em clorofórmio, apresentando coloração com tonalidade que varia de amarelo a vermelho, de acordo com a concentração.

O perfil de absorção espectrofotométrico dos carotenóides apresenta três picos de absorção, dos quais os dois últimos apresentam maior intensidade. Estes podem ser utilizados para a identificação dos carotenóides, pois cada molécula apresenta picos de absorção em comprimentos de onda específicos. Além disso, os isômeros podem ser diferenciados ao se comparar a absorção relativa dos dois últimos picos (BRITTON, 1995).

Em seu trabalho de revisão, SCOTTER (2009), tece algumas considerações sobre a identificação da bixina por meio de espectrofotometria: A localização do pico de absorção fornece informação estrutural sobre a molécula, uma vez que o grupo cromóforo é uma porção grande da molécula; A intensidade do pico de absorção está relacionada tanto à estrutura quanto à concentração do carotenóide, o que torna possível a quantificação; A posição e intensidade do pico de absorção são sensíveis às variações do ambiente, como por exemplo, a polaridade do solvente. Portanto, a partir da comparação entre os espectros de absorção é possível estudar as modificações que ocorrem tanto na molécula quanto no ambiente no qual ela se encontra.

A notação numérica utilizada para descrever a estrutura fina dos espectros é calculada utilizando a razão entre as alturas dos dois picos nos comprimentos de onda mais longos (designados picos II e III, de acordo com a posição), considerando o vale entre eles como o valor zero. A estrutura fina

espectral é então expressa, em porcentagem, como a razão pico III/pico II (BRITTON, 1995). A Figura 3 ilustra a identificação da estrutura fina e pico *cis*, no espectro de absorção da bixina em clorofórmio.



Figura 3. Espectro de absorção de bixina em clorofórmio. Destaque para as regiões utilizadas para a identificação dos isômeros. Obs.: h – altura.

No entanto, a determinação e identificação de bixina parece não ser tão simples, apesar de haver uma robusta produção teórica sobre o assunto. Por exemplo, diversos estudos que se propuseram a determinar o coeficiente de extinção da bixina obtiveram valores bastante conflitantes.

LEVY e RIVADENEIRA (2000) debruçaram-se sobre o assunto e identificaram diversos fatores podem ter influenciado no resultado destas análises, como o uso de cubetas de material inadequado até resíduos de ácido clorídrico no clorofórmio utilizado como solvente.

1.2.5 Atividade biológica de bixina

A bixina e os extratos das sementes do urucum têm sido usados na medicina popular para tratamento de uma grande variedade de doenças e sintomas. Porém, a literatura parece se concentrar no estudo da atividade antimicrobiana, antioxidante e reguladora do metabolismo de lípides e glicose.

1.2.6 Atividade antioxidante

KIOKIAS e GORDON, (2003a;2003b) estudaram a atividade da bixina tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Os autores avaliaram os efeitos da suplementação dietética com uma mistura de carotenóides, entre eles a bixina, contra o stress oxidativo induzido por óleo de peixe. 32 voluntários sadios foram escolhidos e organizados em um estudo duplo cego randomizado. Metade do grupo recebeu diariamente 1 mg de óleo de peixe e a outra metade recebeu, além do óleo de peixe, uma mistura de carotenóides contendo bixina. Após 21 dias, os grupos foram analisados e depois invertidos.

A suplementação com carotenóide causou uma redução no stress oxidativo, indicada pelo menor dano no DNA e aumento da estabilidade *ex vivo* das lipoproteínas de baixa densidade (LDL – *low density lipoprotein*). Também foi observada uma redução nos níveis plasmáticos dos triglicerídios. Porém, bixina e norbixina foram os únicos carotenoides que não foram encontrados no plasma dos voluntários, o que sugere que as moléculas são mais rapidamente metabolizadas e eliminadas. Somando isso ao fato de que no estudo *in vitro* a bixina possui uma atividade antioxidante muito maior que o beta caroteno, os autores sugeriram que este efeito pode estar relacionado a outro mecanismo de ação, e não apenas à neutralização de espécies reativas de oxigênio.

Uma série de estudos investigaram a ação da bixina contra a toxicidade induzida pela cisplatina. A cisplatina é um potente agente contra uma grande variedade de tumores, como bexiga, cabeça e pescoço, gônadas e tumores de células pequenas pulmonares (ROSENBERG, 1985). Porém, o fármaco causa efeitos adversos bastante severos, principalmente relacionados à função renal. A geração de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e supressão de mecanismos antioxidantes são os principais fatores envolvidos na toxicidade (OZKOK & ELDERSTEIN, 2014).

O primeiro estudo foi conduzido por SILVA (2001) e seus colaboradores. Ratos Wistar foram alimentados com 2,5 ou 5,0 mg de bixina/kg de massa corporal por 48 horas, 24 horas e 10 minutos antes de uma injeção de cisplatina na dose de 5,0 mg/kg de massa corpórea. Um grupo controle foi mantido para comparação. 24 horas após a injeção, os animais foram sacrificados e analisados. Os animais que receberam bixina além da injeção da cisplatina apresentaram 33% menos danos no DNA. Além disso, apresentaram níveis normais de peróxidos lipídicos e glutationa renal enquanto os animais que receberam apenas cisplatina tiveram um aumento de 29% tanto nos níveis de peróxidos lipídicos quanto na depleção de glutationa renal.

Nos estudos de ANTUNES e colaboradores (2005) com linfócitos humanos, as células coletadas de 6 voluntários sadios foram tratadas com cisplatina a 0,5 µg/mL e bixina até 10,0 µg/mL. Os linfócitos que foram tratados com cisplatina e bixina (5,0 µg/mL) apresentaram 35% menos aberrações cromossômicas do que os linfócitos tratados com cisplatina somente.

Resultados similares foram obtidos por SANTOS (2012). Células da linhagem PC12, derivada de ratos, foram tratadas com cisplatina na dose de 0,1 µg/mL e bixina na concentração de 0,05, 0,08 e 0,1 µg/mL. Células tratadas com a maior concentração de bixina, comparada às células tratadas apenas com cisplatina, exibiram uma redução em ambos os marcadores de genotoxicidade, sendo ocorrência 85% menor de micronúcleos e 50% menos DNA na cauda celular, no teste do cometa.

RIOS e colaboradores (2009) demonstraram *in vitro* que a bixina é capaz de neutralizar as espécies reativas de oxigênio geradas na interação cisplatina-DNA. Foi observado que a bixina a 100 μ mol/L foi capaz de reduzir em 82% a geração de ânion superóxido (O_2^-) e em 42% o total de espécies reativas de oxigênio produzidas.

A atividade genoprotetora da bixina também foi avaliada frente a outros agentes mutagênicos. BARCELOS e colaboradores (2009) avaliaram o efeito protetetor da bixina contra a ação de benzo[a]pireno, doxorrubicina e metilmetanossulfonato em cultura de células da linhagem HepG2. Na dose de 10 µg/mL, a bixina foi capaz de minimizar os efeitos de benzo[a]pireno e doxorrubicina, mas nenhum efeito foi observado quanto ao metilmetanossulfonato.

Os autores ainda destacaram que o efeito protetor foi observado mesmo quando a adição de bixina não foi concomitante ao mutagênico, mas sim previamente. Isto sugere, segundo os pesquisadores, que o mecanismo de ação deve envolver alguma etapa relacionada às enzimas de metabolização de Fase 1 e 2. Observação semelhante foi feita por KIOKIAS e GORDON (2003a; 2003b) em seus estudos com humanos.

A bixina também exibiu efeito protetor contra 1,2 dimetil-hidrazina em ratos da raça Wistar (OLIVEIRA et al.,2014), porém nem todos os tecidos parecem gozar da mesma proteção. Foi observado que a bixina, ministrada por 7 dias aos ratos na dose de 10 mg/kg de massa corpórea reduziu significantemente os danos causados no DNA de hepatócitos, porém nenhum efeito foi observado sobre células do cólon.

A partir dos estudos analisados, é possível concluir que a bixina de fato exibe uma atividade antioxidante do ponto de vista químico, mas que nem sempre se traduz em efeito protetor de danos oxidativos ao DNA. Como observado por alguns autores, a mecanismo de ação pode estar relacionado a outros processos celulares, como regeneração de glutationa (SILVA et al., 2001) e metabolização por enzimas hepáticas (BARCELOS et al, 2009; KIOKIAS E GORDON, 2003a; KIOKIAS E GORDON, 2003b).

Ou mesmo, a bixina pode não apresentar efeito protetor algum, dependendo do agente mutagênico, como visto nos estudos de OLIVEIRA e colaboradores (2014) e BARCELOS e colaboradores (2009). Um resumo destes estudos está sistematizado nos Quadros 1 e 2.

Autor	Modelo experimental/resumo do protocolo	Parâmetros analisados		Efeito observado
ANTUNES et al., 2005	Linfócitos humanos / Bixina de 1.0 a 10.0 µg/mL / Cisplatina a 0,5 µg/mL / 24 horas de interação	Aberrações cromossomais		Redução de 34.8% por bixina a 5.0 µg/mL
RIOS et al.		Geração de ânion superóxido		Redução de 82% por bixina a 100 µmol/L
	In vitro (quimioluminescência) / Bixina de	EROs Totais		Redução de 42% por bixina a 100 µmol/L
(2009)	Cisplatina a 150 µmol/L	Formação de produtos de degradação		Sem quantidades significativas
		٦	Feste do micronúcleo	
	Células HepG2 / Bixina 0.1 to 10 μg/mL 24 horas de interação / Agente mutagênico adicionado com pré- tratamento, tratamento simultâneo ou pós-tratamento com bixina.	Benzo[a]pireno	Pré-tratamento	Redução de 42% por bixina a 10 µg/mL
			Tratamento simultâneo	Redução de 45% a 1 μg/mL e 64% por bixina a 10 μg/mL
			Pós-tratamento	Sem efeito
BARCELOS		Doxorrubicina	Pré-tratamento	Redução de 44% a 1 μg/mL e 43% por bixina a 10 μg/mL
et al., 2009			Tratamento simultâneo	Redução de 61% a 1 μg/mL e 74% por bixina a 10 μg/mL
			Pós-tratamento	Sem efeito
			Pré-tratamento	
		Metil-metano	Tratamento simultâneo	Sem efeito
			Pós-tratamento	
	Células PC12 / Bixina de 0,05 a 0,10	Teste do micronúcleo Ensaio do cometa		Redução de 85.1% por bixina a 0.1 µg/mL
SANTOS et al., 2012	μg/mL 24 horas de interação / Cisplatina a 0,1 μg/mL			Redução de 50% na porcentagem de DNA na cauda

Quadro 1. Estudos in vitro sobre a atividade antioxidante e genoprotetora da bixina.

Autor	Modelo experimental/resumo do protocolo	Parâmetros analisados	Efeito observado
	Ratos Wistar (medula óssea e rins) / Bixina a 2,5 ou 5,0		Redução de 33% em metáfase
SILVA et al.,	mg/kg de massa corpórea / 3 dias de pré-tratamento	Aberrações cromossonicas	anormais por bixina a 5.0 mg/kg
2001	seguido por injeção de cisplatina 5,0 mg/kg de massa	Peroxidação lipídica e nivel de	Preveniu peroxidação lipídica e
	corpórea	glutationa	depleção de glutationa
			Sem redução significativa no
KIOKIAS and	Humanos e in vitro / Mistura de carotenoides mais óleo de	Perfil lipídico e lipids totais	colesterol total, HDL e LDL.
GORDON,	peixe		Diminuição dos triglicérides.
2003b	4 vezes ao dia por 21 dias	Maraadaraa da atraaa avidativa	Aumento menos pronunciado nos
			marcadores de stress oxidativo
	Ratos Wistar (fígado) / Bixina de 0,07 a 4,23 mg/kg de	Encaio do comoto	Bixina não possui efeito pró ou anti
	massa corpórea / 10 semanas de tratamento (2 semanas	Elisalo do cometa	carcinogênico
	de bixina + 8 semanas de dieta comercial); Injeção de		
al., 2004	dietil-nitrosamina a 200 mg/kg de massa corpórea na	Focos pré-neoplásicos	Sem efeito
	segunda semana.		
	Ratos Wistar (cólon e figado) / Bixina a 0,1, 1,0 and 10		
	mg/kg de massa corpórea / 7 dias de tratamento com		Sem efeito em células do cólon
	bixina seguido por injeção de 1,2 dimetil-hidrazina (ensaio	Comet assay / Aberrant crypt foci	Redução significativa nos danos ao
ai., 2013	do cometa) ou 4 semanas de tratamento com bixina mais) ou 4 semanas de tratamento com bixina mais	
	mutagênico (ensaio de focos de criptas aberrantes)		

Quadro 2. Estudos in vivo sobre a atividade antioxidante e genoprotetora da bixina.

1.2.7 Efeitos da bixina no metabolismo

Além da atividade antioxidante da bixina, mais recentemente tem crescido o interesse por seus efeitos no metabolismo, sobretudo com o aumento na demanda pelos alimentos ditos funcionais.

Os grupos dos pesquisadores OLIVEIRA (2001) e LIMA (2003), verificaram que a bixina é capaz de reduzir a hiperlipidemia em coelhos. OLIVEIRA e colaboradores (2001) utilizaram coelhos hiperlipidêmicos (induzida com Triton 300 mg/kg de massa corpórea, 20 horas antes da administração de bixina) para avaliar o impacto no colesterol total, colesterol-HDL e triacilglicerois. 24 horas após administração de bixina, os coelhos apresentaram redução no nível de colesterol e triacilgliceróis, porém o nível plasmático de colesterol-HDL continuou elevado.

Num estudo de médio prazo, resultados similares foram encontrados (LIMA et al, 2003). A hiperlipidemia foi induzida em coelhos por colesterol e ácido cólico. Durante 28 dias os animais receberam uma dose diária de bixina de 0,01 mol/kg de massa corpórea mais os indutores de hiperlipidemia. Ao final do período foram dosados, entre outros parâmetros, colesterol, colesterol-HDL, triacilgliceróis, uréia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais, cálcio, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase. Todos os parâmetros analisados, e que foram elevados pela hiperlipidemia, tiveram seus valores reduzidos com o consumo de bixina.

De forma similar, porém em estudo com ratos, ROEHRS e colaboradores (2014) determinaram que a bixina a 100 mg/kg de massa corpórea foi capaz de controlar a glicemia e hiperlipidemia em animais diabéticos induzidos com estreptozotocina, com eficiência comparável à da metformina. Os autores destacaram que a norbixina, ao contrário da bixina, não teve efeito algum sobre a maioria dos parâmetros avaliados, além de elevar os níveis de colesterol-LDL, triglicérides e peroxidação lipídica. Isto sugere que a lipossolubilidade da bixina é crucial para os efeitos observados.

GOTO e colaboradores (2012) chegaram a resultados parecidos em estudo com camundongos KK-Ay obesos. A administração de bixina por três semanas promoveu efeitos benéficos para tratar disfunções relacionada à obesidade, como hiperglicemia, hiperinsulinemia e hipoadiponectinemia. Tolerância à glicose e insulina também foram atenuadas. Os autores relacionaram esta ação da bixina com a ativação de receptores do tipo PPAR-γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*) (TAKAHASHI et al. 2009). Ambos os autores acima demonstraram que a bixina liga-se ao PPAR-γ e ao PPAR-α em adipócitos 3T3-L1 em hepatócitos HepG2, respectivamente.

1.2.8 Metabolização da Bixina

A bixina tem atividade indutora das enzimas hepáticas em ratos e em culturas de células humanas.

JEWELL and O'BRIEN, (1999) observaram a indução de enzimas do citrocromo P450 em ratos Wistar com alimentação suplementada com bixina 300 mg/kg de massa corpórea por 16 dias. Os autores analisaram o fígado, os pulmões, rins e intestino delgado. A indução foi verificada utilizando os seguintes substratos como indicadores da atividade do citrocromo P450: etoxiresorufina (CYP1A1), metoxiresorufina (CYP 1A2), pentoxiresorufina (CYP 2B1/2) e benziloxiresorufina (1A1/2, 2B1/2 e 3A). No fígado, todas as enzimas foram induzidas significativamente. Nos rins, apenas algumas enzimas foram induzidas, enquanto que nos pulmões e intestino delgado pouco ou nenhum aumento na atividade das enzimas foi observado.

Aparentemente, o efeito indutor depende da duração do consumo de bixina. DE-OLIVEIRA e colaboradores (2003) estudaram o efeito da suplementação por 5 dias com bixina (250 mg/kg de massa corporal) em ratos Wistar. O efeito indutor observado foi bem menor do que os resultados obtidos por JEWELL e O'BRIEN (1999).

Os estudos acima não utilizaram bixina purificada, mas extratos comerciais das sementes de urucum, com exceção de uma das amostras com teor de 95% de bixina. É possível que outros compostos também contribuam para a atividade indutora. Por exemplo, no estudo de DE-OLIVEIRA e colaboradores (2003) a amostra com 28% de bixina apresentou uma atividade indutora superior à amostra contendo 95% de bixina.

Em cultura celular da linhagem HepG2, o tratamento com bixina a 0,1 mmol/L por 48 horas causou aumento nos níveis de expressão nos genes relacionados ao CYP1A1 e CYP1A2 (MATUO et al., 2013). Porém, não foram observados efeitos na expressão das demais enzimas avaliadas (CYP2B6,

2C9, 2E1 e 3A4). Os resultados dos estudos sobre a o impacto da bixina sobre as enzimas de metabolização estão resumidos no Quadro 3:

Autor	Modelo experimental	Resumo do protocolo	Enzima/expressã o gênica avaliada		Atividade/expressã o (em relação ao controle)
		Bixina 300 mg/kg de	Fígado	EROD MROD BROD PROD	6.2 4.0 2.5 5.5
JEWELL and O'BRIEN, 1999	Ratos Wistar (machos)	massa corpórea/ dia	Pulmão	EROD MROD BROD PROD	4.3 2.1 0.7 0.9
		16 dias	Rim	EROD MROD BROD PROD	10.5 - 2.7 -
DE- OLIVEIR	Ratos Wistar	Bixina 250 mg/kg de massa corpórea/	Extrato de urucum (28% de bixina)	ECOD EROD MROD BROD PROD A4H	3.8 4.2 2.4 3.3
A et al., 2003	(fêmeas)	dia 5 dias	Bixina (95% pure)	ECOD EROD MROD BROD PROD A4H	1.0 2.7 2.3 1.4 2.9 1.0
MATUO et al., 2013	Células Hepg2	Bixina 0,1 mMol/L 24 e 48 horas de interação com as células	24 horas 48 horas	CYP1A1 CYP2B6 CYP2C9 CYP2E1 CYP3A4 CYP1A1 CYP1A2 CYP2B6 CYP2C9 CYP2E1 CYP3A4	60 10 - - - 25 10 - - - - -
EROD - Etoxiresorufina-O-desetilase MROD - Metoxiresorufina-O-desmetilase BROD - Benziloxiresorufina-O-desarilase					

Quadro 3. Estudos sobre a bixina e sua capacidade indutora de enzimas de metabolização.

PROD - Pentoxiresorufina-O-despentilase ECOD - 7-etoxicumarina-O-desetilase

A4H - Anilina-4-hidroxilase

•

1.2.9 Formulações Nanotecnológicas de Bixina

A baixa solubilidade e a fotossensibilidade são os principais desafios encontrados no emprego da bixina pela indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. À semelhança dos demais carotenóides, a bixina é instável quando exposta ao oxigênio e calor, principalmente na presença de luz, devido às suas nove ligações duplas conjugadas. Esta longa cadeia carbônica somada à terminação metil-éster conferem também um forte caráter hidrofóbico à molécula (BARBOSA, BORSARELLI, & MERCADANTE, 2005; LYNG, PASSOS, & FONTANA, 2005; MARCOLINO ET AL., 2011; PARIZE ET AL., 2008).

A complexação e encapsulação têm sido estudadas como uma promissora técnica para aumentar a estabilidade e solubilidade da bixina e outros carotenóides, acompanhando um aumento na demanda por alimentos ditos "funcionais". Diversas partículas, em escalas nano e micrométrica, foram desenvolvidas e demonstraram capacidade de proteger a bixina contra a oxidação e perda de cor, além de aumentar a solubilidade em água. Entre estas partículas estão as ciclodextrinas, nanoparticulas lipídicas, nanocápsulas poliméricas, caseinato e micelas.

Moléculas de bixina podem ser complexadas no interior de α ciclodextrinas (LYNG et al., 2004) e β -ciclodextrinas (MARCOLINO et al., 2011). As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, produzidos a partir de degradação enzimática de amido. São formadas por moléculas de glicopiranose ligadas em configuração α -1-4, organizadas de forma a produzir estruturas semelhantes a um "tubo", onde podem ser inseridas moléculas com certo caráter apolar, pois o interior do "tubo" é menos polar que a água (UEKAMA, 1998). As letras gregas α e β designam o número de sacarídeos que compõem a ciclodextrina, neste caso, 6 e 7 moléculas respectivamente. Tanto a α -ciclodextrina quanto a β -ciclodextrina se mostraram capazes de incorporar a bixina em seu interior, provendo proteção contra agentes

LYNG e colaboradores (2004) compararam os efeitos da luz e exposição ao ar de amostras de bixina livre e bixina complexada em α-ciclodextrina. Sob efeito de apenas luz ou calor, a bixina livre sofreu perda de cor da ordem de 25% em seis dias, enquanto a bixina complexada perdeu menos de 2% da

oxidantes, luz e calor.

17

intensidade da cor no mesmo período. Quando foram submetidas ao tratamento luminoso e térmico concomitantemente, as perdas foram de 45% e 15% para bixina livre e complexada, respectivamente. Numa situação mais extrema, as amostras foram tratadas com borbulhamento de ozônio por 30 minutos, o que causou uma degradação de 70% da bixina livre e 37% da bixina complexada com α -ciclodextrina.

Bixina complexada à β-ciclodextrina pode ser usada para colorir produtos lácteos, sem impacto negativo nas características organolépticas, além de oferecer uma manutenção prolongada da cor (MARCOLINO et al, 2011).

A encapsulação da bixina foi investigada por diversos autores. Os agentes encapsulantes foram goma arábica e maltodextrina (BARBOSA et al., 2005) e micelas de caseína (ZHANG e ZHONG, 2014), polímeros (LOBATO et al., 2013;2014; BOSCHETTO et al., 2014) e lipídios (RAO et al., 2014)

A bixina encapsulada com goma arábica foi estável mais de 3 vezes do que a bixina encapsulada com maltodextrina. No entanto, os dois agentes encapsulantes proporcionaram à bixina uma estabilidade dez vezes maior do que se estivesse livre (BARBOSA et al., 2005).

ZHANG e ZHONG (2014) utilizaram caseinato de sódio para imobilizar a bixina. Os autores dissolveram bixina e caseinato em uma solução etanólica a 40% e secaram em *spray dryer*, obtendo nanocápsulas da ordem de 250 nm, que prontamente se dissolveram em água. A encapsulação em caseinato de sódio reduziu a degradação térmica e luminosa.

Quadro 4. Formulações nanotecnologicas de bixi	na.
--	-----

Autor	Agente encapsulante	Método de preparação	Diâmetro médio das partículas	Eficiência de encapsulamento
BARBOSA et al., 2005	Goma arábica + Polisorbato 80 Maltodextrina+ Polisorbato 80	Spray drying	Não determinado	86% (Goma arábica) 75% (Maltodextrina)
LOBATO et al., 2013;2014	Poli-ε-caprolactona	Deposição interfacial	195 nm	>99%
SANTOS & MEIRELES, 2013	Polietilenoglicol 10,000	Encapsulação baseada em fluido supercritico	33 µm	62%
ZHANG & ZHONG, 2014	Caseinato de sódio	Spray drying	200 nm	90.2%
BOSCHETTO et al., 2014	Poli (3-hidroxibutirato- co-hidroxivalerato)	Dispersão de solução mehorada por fluidos supercríticos - Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids (SEDS)	0.20-0.55 μm	6.36% a 92.02%
RAO et al., 2014	Trimiristina + monoestearato + lecitina	Homogeneização a quente seguida por sonicação	135-352 nm	>99%

RAO e colaboradores desenvolveram nanopartículas sólidas para o carreamento de bixina no tratamento de hepatotoxicidade. A bixina foi quantitativamente incorporada nas partículas de 135-352 nm produzidas com uma mistura de trimiristina e monoestearato de glicerol como matriz lipídica e lecitina como estabilizante. A liberação de bixina foi monitorada em um período de 24 horas. Foi determinado que a liberação obedece a um modelo cinético de primeira ordem neste período e ocorre a liberação de cerca de 75% da bixina.

As nanopartículas lipídicas de bixina foram capazes de proteger ratos Wistar contra hepatotoxicidade induzida por paracetamol (3 g/kg de massa corpórea). Os animais foram tratados por sete dias com formulações contendo estas nanopartículas e então submetidos à indução de hepatotoxicidade. Os animais que receberam bixina mostraram sinais de hepatotoxicidade em menor escala, tanto na análise de parâmetros bioquímicos quanto na análise histopatológica.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

Inicialmente, entender o fenômeno da dispersão da bixina em água, foi a justificativa principal para o desenvolvimento deste projeto. Durante o levantamento bibliográfico, foi constatado que a bixina, para além do uso como corante, é uma molécula versátil: é pouco tóxica, facilmente extraída e possui um amplo espectro de ação biológica.

Somado a isso, as sementes de urucum são produzidas no Brasil em valores expressivos, da ordem de 10 mil toneladas/ano, sendo uma importante atividade econômica, sobretudo em comunidades do extremo oeste paulista. Isto posto, o presente projeto foi desenvolvido com objetivo de investigar a formação, comportamento e aplicação de partículas nanométricas de bixina. Consideramos este o primeiro passo no desenvolvimento de uma formulação nanotecnológica, para administração da própria bixina ou para carreamento de fármacos.

Um sistema carreador de fármacos baseado em bixina teria como vantagem, quando comparada aos compostos lipídicos e poliméricos usualmente empregados no desenvolvimento desse tipo de formulações, a baixa toxicidade, além de conferir um maior valor a um produto produzido em larga escala no Brasil.

De modo amplo, o propósito deste trabalho foi caracterizar e aplicar uma dispersão de partículas manométricas de bixina em água, composto isolado de a partir de extrato comercial de semente de urucum.

Especificamente, a finalidade foi padronizar um método de obtenção de bixina a partir de extrato de urucum e dispersá-la em forma de nano partículas em água; investigar sua estabilidade em função do tempo, e efeitos da variação de pH e concentração de íons sobre estas dispersões. Também foi avaliada sua capacidade carreadora de fármacos, utilizando daunorrubicina e a linhagem celular A549 como modelos experimentais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

A bixina utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pela CORANTEC Corantes Naturais LTDA na forma de bixina pó e posteriormente purificada. O teor foi determinado por método espectrofotométrico (FAO/WHO, 1982), consistindo na extração da bixina com clorofórmio e determinação da absorbância a 470 nm, considerando o coeficiente de extinção da bixina em clorofórmio como referência.

As soluções de Ácido Clorídrico (HCl), Hidróxido de Sódio (NaOH), Cloreto de Sódio (NaCl) e os solventes clorofórmio e acetona utilizados foram todos de grau analítico. A água utilizada foi obtida por sistema de ultrapurificação do tipo "*Milli-q*"

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção de bixina a partir de matéria-prima obtida no mercado

Aproximadamente 1 g do extrato lipossolúvel de urucum foi pesado analiticamente e suspenso em 100 mL de acetona, aquecido em banho de água até a ebulição (em torno de 60 °C) e filtrado ainda quente. O filtrado foi coletado em frasco de vidro âmbar previamente aquecido a 60 °C e submetido a resfriamento até a temperatura ambiente de forma lenta.
Uma vez atingida a temperatura ambiente, a amostra foi transferida para refrigerador a 4°C por um período de 6 horas e depois para freezer a -20 °C, onde permaneceu por 12 horas. Os cristais formados foram coletados por filtração a vácuo, utilizando-se material previamente resfriado a -20 °C.

3.2.2 Determinação de ponto de fusão

Os pontos de fusão das amostras de bixina foram determinados em medidor de ponto de fusão, da marca GEHAKA[®] modelo PF1000. As amostras foram inseridas em tubos capilares de vidro de 1 mm de diâmetro interno e 75 mm de comprimento, em duplicata. O compartimento para acomodação das amostras no equipamento foi aquecido até aproximadamente 180°C e então, introduzidos os capilares. A seguir, a temperatura do bloco de aquecimento foi elevada na taxa de 1°C por minuto, até a fusão total das amostras.

3.2.3 Análise por Calorimetria Exploratória Diferencial

As curvas calorimétricas foram obtidas pelo método de Calorimetria Exploratória Diferencial (*Differential Scanning Calorimetry* - DSC). Foi utilizado o calorímetro Q20, da marca TA Instruments[®], com fluxo de nitrogênio padrão analítico de 50 mL/min, como gás de purga da amostra. As amostras foram avaliadas na faixa de 25 até 400°C, com 5 taxas de aquecimento: 2, 3, 5, 6 e 10°C/min. A amostra foi acondicionada em um porta-amostra de alumínio e a massa utilizada foi de 2,0 ± 0,1 mg.

3.2.4 Espectrofotometria

Os espectros de absorção UV-Visível das amostras de bixina purificada e da dispersão de bixina foram obtidos pelo uso do equipamento Thermo Scientific UV-Vis Evolution 200, em cubetas de vidro com tampa, de 1 cm de caminho óptico.

Para a determinação de teor de bixina, foi utilizado o intervalo de varredura de 300 a 600 nm, com tempo de integração de 0,5 s e clorofórmio puro como branco.

Configurações semelhantes foram utilizadas na análise das dispersões de bixina, exceto pela utilização de uma solução hidroetanólica a 10% como branco.

3.2.5 Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para esta etapa foi utilizado um sistema HPLC Thermo System SCM-1000 (Thermo Scientific[®]) equipado com detector de arranjo de fotodiodos (PDA) e amostrador automático. A análise foi realizada em coluna de octadecilsilano Spherisorb (Waters, Milford, EUA) C₁₈ 250mm x 5mm e diâmetro de partícula de 5 µm.

10 mg dos cristais de bixina foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio e diluídos neste mesmo solvente até a concentração final de 10 μg/mL. Desta última solução, 5 μL foram aplicados na coluna e eluídos por um sistema isocrático composto pelos solventes Acetonitrila:Ácido acético a 2%:diclorometano, na proporção de 63:35:2 em volume. A fase móvel foi mantida em um fluxo constante de 1 ml/min e a temperatura de 25°C.

A detecção pelo arranjo de fotodiodos foi realizada no intervalo de 300 a 600 nm.

3.2.6 Preparação da dispersão de bixina

A dispersão de bixina foi preparada segundo patente depositada pelo nosso grupo (PINTO et al., 2009), baseado no método de injeção etanólica de BATZRI e KORN (1973). Bixina foi acuradamente pesada e solubilizada em etanol. Esta solução foi lenta e continuamente injetada, sob agitação e temperatura constantes, em uma solução aquosa na proporção de 1:10, onde foi dispersa.

3.2.7 Efeito do pH no preparo e estabilidade da dispersão

Para este estudo, as dispersões foram preparadas por dois métodos distintos. O primeiro procedimento foi a injeção da solução etanólica de bixina diretamente em solução com pH ajustados no valor desejado. No segundo caso, a dispersão previamente formada em ambiente neutro foi diluída nas soluções com pH ajustado.

Para ajuste do pH foram utilizadas soluções-padrão de NaOH 1 mol/L e HCl 1 mol/L, produzindo soluções na faixa de pH=1,0 a pH=13,0. A avaliação foi realizada por observação na formação de precipitados e por espectrofotometria de absorção na região de 300 a 600 nm.

3.2.8 Efeito da concentração de NaCl no preparo e estabilidade da dispersão

De modo semelhante ao descrito no item 4.2.7, as dispersões para avaliação dos efeitos da concentração de NaCl sobre sua estabilidade foram preparadas de duas maneiras: a) injeção da solução etanólica de bixina diretamente em solução salina e b) a dispersão previamente preparada em ambiente neutro e posteriormente diluída nas soluções salinas.

Para ajuste da concentração do cloreto de sódio foram utilizadas soluções-padrão de NaCl 1 mol/L, com a obtenção de concentrações que variaram de 1,0 a 300,0 mMol/L, baseando-se em estudos anteriores de outros pesquisadores (CARMONA-RIBEIRO; HIX, 1991; CARRION; MAZA; PARRA, 1994).

3.2.9 Aplicação da dispersão de bixina para carreamento de fármaco anitumoral (daunorrubicina)

As células da linhagem A549, derivadas de carcinoma pulmonar humano, foram utilizadas para avaliar a eficácia da capacidade carreadora da dispersão de bixina. Células foram cultivadas em frascos plásticos de 75 cm², meio de cultura DMEM com adição de 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufas de incubação a 37°C e 5% CO₂. Uma subcultura das células foi realizada sempre que o nível de confluência atingiu cerca de 80%.

Foi realizada uma comparação da atividade inibidora da proliferação de células tumorais entre a daunorrubicina livre e o fármaco combinado com a dispersão de bixina. Esta análise foi realizada através do ensaio de redução do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (HEO et al., 1990).

Para este ensaio, as células foram cultivadas até atingir cerca de 80% de confluência, removidas dos frascos de cultivo por tripsinização e suspensas em solução tampão fosfato-salino. Uma alíquota de 1 mL da suspensão celular foi corada com Trypan Blue 0,4% (p/v), um marcador de viabilidade celular, e realizada contagem de células viáveis em câmara de Neubauer.

A suspensão foi ajustada para uma concentração celular de 10⁵ células viáveis/mL e transferidas para placas de policarbonato de 96 poços de fundo

chato, de modo a se obter 10⁴ células/poço, e incubadas por 18 horas nas mesmas condições de manutenção.

Após incubação, o meio de cultura foi substituído por 200 µL de meio fresco contendo as soluções-teste de daunorrubicina, associada ou não às dispersões de bixina.

Transcorrridas 24 horas de interação, o meio de cultura contendo as soluções-teste foi substituído por outro fresco e adicionado 10 µL de reagente MTT (5mg/mL). Os cristais de formazana, resultantes da metabolização do MTT pelas células viáveis, foram solubilizados com adição de 100µL de Dimetil sulfóxido (DMSO).

As placas foram analisadas em leitor de microplacas modelo LM-LGC (LGC Biotecnologia) em sextuplicata, correlacionando a extensão da conversão do MTT em formazana com a viabilidade celular (BERRIDGE; TAN, 1993).

A dispersão de bixina contendo daunorrubicina foi preparada de forma semelhante ao descrito no item 4.2.6. Porém, a solução etanólica de bixina não foi injetada em água, mas sim em soluções aquosas de daunorrubicina em concentrações tais que, após a adição da bixina, resultaram nas concentrações finais de 0,01 a 20 µmol/L. Como controle negativo, foi utilizada uma solução aquosa contendo 10% de etanol.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção de Bixina.

4.1.1 Purificação de bixina

Em um primeiro momento, a bixina foi obtida por purificação de corantes disponíveis comercialmente, segundo metodologia de HERNANDEZ (1994). Este método preconizava a suspensão do pó de bixina em acetona:isopropanol (1:1), seguida de 2 horas de agitação. Esta suspensão foi filtrada ainda quente e, após o resfriamento, acidificada para a precipitação da bixina.

Este método não se adequou totalmente às condições de nosso laboratório e às amostras disponíveis pelo nosso grupo. Não foi observada a precipitação de bixina do modo descrito pelo autor, nem em volume, tampouco em pureza e aparência.

Em geral, os cristais de bixina são descritos na literatura (JUAREZ, 2005; SCOTTER, 2009; RIOS & MERCADANTE, 2004; ZECHMEISTER &

ESCUE, 1953), como agulhas de coloração púrpura. No entanto, os cristais obtidos segundo a metodologia de HERNANDEZ (1994) apresentaram cristais amorfos de coloração escarlate, tendendo para o laranja.

Consideramos que essa disparidade se deve à presença de produtos de degradação da bixina, principalmente um éster monometílico do ácido 4,8,dimetil-tetradecahexaenedióico, ou como é comumente chamado, produto de degradação da bixina "C₁₇", em alusão aos 17 carbonos que compõem sua cadeia poliênica (SCOTTER, 2009).

O composto C₁₇ possui uma coloração amarela, e é formado a partir da *cis*-bixina por um mecanismo que envolve a eliminação de uma molécula de mxileno (MCKEOWN, 1963). Além disso, o período de agitação de duas horas e a adição de ácido parecem ter contribuído para a degradação da molécula de bixina. Como alternativa, um método proposto por JUAREZ (2005) e variações deste foram avaliados. Os resultados das purificações testadas estão resumidos na Tabela 1.

	Rendimento	Teor após	Ponto de	Aporôncio
Metodo de pullicação		purificação	fusão (°C)	Арагенска
Precipitação em meio ácido		53,3%	180-186	Precipitado fino, cor escarlate.
(HERNANDEZ,1994)				
Recristalização com acetona.	70/	95,5%	195,2 - 198,8	Precipitado com grumos de
Modificado de JUAREZ, 2005.	1 /0			coloração violeta.
Recristalização com etanol	8,8%	150%	ND	Precipitado fino, avermelhado.
Recristalização com	8,0%	200%	198	Precipitado com grumos de
Isopropanol:Acetona (1:1)		18,4%	ND	coloração violeta.
Extração com diclorometano e	NP	NP	NP	ND
recristalização em etanol.				INF.
Extração com Hexano +	ND	Não analisado	Não	Precipitado
Evaporação com fluxo de N2			analisado	amarelado.
Extração com Clorofórmio +	ND	34 6%	185,2	Precipitado fino, avermelhado
Evaporação com fluxo de N2		54,070		

Tabela 1. Avaliação dos métodos de purificação de bixina pelos precipitados obtidos.

NP = Não houve formação de precipitado.

ND = Não determinado

O método adotado para desenvolvimento deste projeto foi o de recristalização em acetona, modificado de JUAREZ (2005) e descrito a seguir. Este se mostrou mais adequado, tanto em simplicidade, quanto em pureza dos cristais e reprodutibilidade.

Aproximadamente 1 g do extrato lipossolúvel de urucum foi adicionado em 100 mL de acetona. A suspensão foi aquecida em banho de água até a ebulição (em torno de 60 °C) e filtrada ainda quente. O filtrado foi coletado em frasco de vidro âmbar previamente aquecido a 40°C e mantido em caixa com isolamento térmico, de forma que o resfriamento até a temperatura ambiente ocorresse lentamente.

Uma vez atingida a temperatura ambiente, a caixa térmica foi transferida para refrigerador e, após o equilíbrio térmico, o conjunto seguiu para freezer a - 20°C, onde permaneceu até o dia seguinte.

Os cristais formados foram coletados por filtração a vácuo, utilizando-se material previamente resfriado a -20°C. Procederam-se a análise de ponto de fusão e determinação de teor de bixina dos cristais. Os cristais obtidos apresentaram aspectos aciformes (Figura 4) e coloração púrpura, à semelhança do descrito na literatura (JUAREZ, 2005).



Figura 4. Micrografia ótica de cristais de bixina em acetona. Aumento de 400 vezes.

4.1.2 Análise da bixina

Os cristais analisados em medidor de ponto de fusão comum exibiram uma faixa de fusão de 195,2 a 198,8°C. Este valor é bastante próximo ao descrito nos estudos de MCKEOWN & MARK (1961) e LIDE (1995), os quais determinaram a fusão de *cis*-bixina em 196,8°C e 198,0°C, respectivamente. No entanto, persistem na literatura discrepâncias significativas entre os valores de ponto de fusão da bixina, como ilustra o Quadro 5.

Isômero de bixina	Ponto de fusão (°C)	Referência
<i>cis</i> -bixina	189-190,5	REITH & GIELEN, 1971
<i>cis</i> -bixina	196,8	MCKEOWN & MARK, 1962
<i>cis</i> -bixina	198,0	LIDE, 1995
<i>cis</i> -bixina	217,0	LEWIS,1993
<i>cis</i> -bixina	189-191	MERCK, 2013
trans-bixina	204,0-206,0	REITH & GIELEN, 1971
trans-bixina	216,0-217,0	KARRER & JUNKER, 1950
trans-bixina	204,0-206,0	MERCK, 2013

Quadro 5. Pontos de fusão de bixina relatados na literatura.

Mesmo o manual de referência Merck Index apresenta valores conflitantes entre si, a depender da versão de publicação. A monografia da edição publicada em 2001 (MERCK, 2001), muito semelhante à edição de 1976 (MERCK, 1976), descreve a *trans*-bixina (a *cis*-bixina sequer foi citada) como cristais em formato de placa, com coloração de laranja a púrpura que se decompõem a 217°C. Os máximos de absorção em clorofórmio relatados são 443, 475 e 509 nm. No entanto, a edição lançada em 2013 já especifica os pontos de fusão de *trans* e *cis*-bixina. Além disso, a edição mais recente determina que os máximos de absorbância da bixina em clorofórmio ocorrem a 470 e 501 nm.

Tais variações no ponto de fusão podem ser devido à presença de polimorfismos nos cristais, ou mesmo, devido à proporção dos isômeros *cistrans* presentes na amostra. Para investigar essa possibilidade, os cristais foram submetidos à análise por calorimetria exploratória diferencial (*Differential*

Scanning Calorimetry - DSC), cujos resultados estão resumidos nas Figuras 5 e 6 e na Tabela 2.

de aqueennerit	0.				
Taxa de	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Calor de	Pureza
	inicial (°C)	final (°C)	de fusão (°C)	reação (J/g)	(mol %)
(C/mm)					
2	192,12	197,65	195,63	86,99	96,30
3	182,56	185,93	184,93	18,77	99,61
5	186,29	190,54	189,39	75,11	97,43
6	187,09	191,61	190,01	52,81	97,81
10	191,60	196,94	194,91	70,32	96,73

Tabela 2. Temperatura de fusão de bixina obtida por DSC em função das variações das taxas de aquecimento.

Entende-se por polimorfismo a tendência de uma substância em cristalizar-se em diferentes estados. Estudar o comportamento polimórfico de fármacos e excipientes é uma parte importante do estudo de pré-formulação.

Com a verificação preliminar de indícios de polimorfismo pela análise da curva por DSC da bixina na razão de aquecimento de 10 °C/min, procedeu-se a um estudo mais detalhado com programação em várias razões de aquecimento, com a finalidade de se detectar a temperatura de fusão da bixina.

Assim, numa taxa de aquecimento de 6ºC/min, foi observado um pico endotérmico e característico de fusão na temperatura de 190,01ºC, com pureza de 97,81 mol % e calor de reação de 52,81 J/g (Figura 5).



Figura 5. Curva DSC da fusão da bixina, na razão de aquecimento de 6 °C/min.

Como o pico obtido foi compatível com o de fusão da *cis*-bixina, pois segundo a literatura esta substância funde-se no intervalo de 189,0-191,0°C (REITH;GIELEN, 1971; MERCK, 2013), foi determinada uma nova curva DSC, desta vez, após o resfriamento da amostra, em temperatura ambiente.



Figura 6. Curvas DSC da bixina na razão de aquecimento de 6 °C/min, antes e após resfriamento.

Na análise após o resfriamento não foi observada nova forma polimórfica (Figura 6), indicando uma alteração irreversível em sua estrutura cristalina, que, por sua vez, sugere que a amostra possui polimorfismo do tipo monotrópico.

No entanto, na taxa de 6°C/min observou-se também um segundo pico endotérmico em 202,0°C, provavelmente relacionado à *trans*-bixina, que possui ponto de fusão no intervalo de 204,0-206,0 °C (REITH & GIELEN, 1971; MERCK, 2013)

A determinação do teor de bixina foi realizada por método espectrofotométrico. Massa de aproximadamente 2 mg de bixina foi pesada, solubilizada e diluída em clorofórmio até obtenção de uma solução de concentração entre 2-10 µg/mL. Posteriormente, foi realizada leitura no comprimento de onda de absorção máxima da bixina em clorofórmio (470 nm), utilizando clorofórmio como branco nas leituras. O teor de bixina foi determinado considerando-se o coeficiente de extinção de bixina, $E_1^{1cm} = 3092$ a 470 nm (SCOTTER, 1994). O cálculo do teor foi realizado utilizando a seguinte equação:

$$\text{Teor} = \frac{A_{\text{amostra}}}{E_{1\%}^{1cm}} \times \frac{M_{\text{teórica}}}{M_{\text{real}}} \times \text{Fd}$$

Onde:

A_{amostra} = Absorção da amostra a 470nm

 E_1^{1cm} = Coeficiente de extinção da bixina a 1%

M_{teórica} = Massa teórica de bixina presente em uma solução a 1%.

M_{real} = Massa de bixina pesada.

F_d = Fator de diluição.

A análise foi realizada em duplicata e o resultado obtido foi de 95,4%.



Figura 7. Espectro de absorção de bixina em clorofórmio e seus picos máximos de absorção.

Parte da divergência entre os aos dados característicos físico-químicos da bixina pode ter sua causa atribuída à origem natural da molécula. Nos extratos de urucum utilizados para os estudos encontram-se isômeros conformacionais de bixina e outras moléculas relacionadas com sua via metabólica. Tais impurezas nem sempre são eliminadas durante o processo de purificação devido a sua grande semelhança com a bixina, o que pode causar variações nas leituras, tornando muito importante a determinação do isômero presente na amostra.

Estudos de identificação e quantificação foram conduzidos por vários autores (MCKEOWN; MARK, 1962; REITH; GIELEN, 1971; RODRIGUEZ-

AMAYA, 1988; SCOTTER et al., 1994; LEVY; RIVADENEIRA, 2000), porém, tanto a determinação do ponto de fusão, quanto a absortividade molar da bixina são alvo de controvérsia na literatura. Os valores variam conforme o solvente utilizado e isômero analisado, além de haver casos em que o isômero não é especificado.

Somente para o clorofórmio, foram encontrados os valores resumidos no quadro 6.

Referência	λ (nm)	E_1^{1cm}
REITH E GIELEN	470	3230
(1971)	501	2880
SCOTTER et al.	470	3092
(1994)	501	2773
LEVY E RIVADENEIRA (2000)	501	2870
MCKEOWN E MARK (1962)	501	2826
RODRIGUEZ-AMAYA	476	3240
(1988)	507	2970

Quadro 6. Coeficientes de extinção de bixina em clorofórmio.

LEVY E RIVADENEIRA (2000) afirmam que a origem de um destes valores errôneos pode ser identificada no estudo de REITH & GIELEN (1971), amplamente utilizado por outros pesquisadores na determinação de bixina. No estudo de 1971, parece ter sido utilizado valor de absorbância a 501 nm (pico III) para o cálculo do coeficiente de extinção, quando deveria ter sido utilizada a absorbância a 470 nm (pico II).

De fato, LEVY e RIVADENEIRA (2000) e MCKEOWN e MARK (1962) recomendam que o pico III seja utilizado nas análises de bixina, visto que este sofre menos interferências de possíveis produtos de degradação da bixina que absorvem nos comprimentos de onda mais curtos, como o próprio C₁₇. Porém,

considerando que os cristais de bixina apresentam pureza de mais de 95%, para este estudo, utilizamos o Pico II devido à sua maior absortividade.

Uma recomendação importante feita por LEVY E RIVADENEIRA (2000), e seguida neste estudo, foi evitar o uso de cubetas de quartzo. A bixina degrada-se a uma taxa surpreendentemente alta quando exposta à incidência de radiação ultravioleta. Os autores constataram que exposição de apenas 10 segundos ao feixe UV do equipamento é capaz de degradar até 5% de bixina. Isto pode ter sido um fator determinante nas discordâncias entre os valores de coeficiente de extinção encontrados na literatura.

Em análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), o teor calculado e a pureza do pico são compatíveis com o relatado por outros pesquisadores (BARETH; STROHMAR; KITZELMANN, 2002; SCOTTER et al., 1994), ilustrado na figura 8. O cromatograma mostra o pico referente à bixina, com tempo de retenção entre 15 e 17 minutos e ponto máximo localizado em 16 minutos. A área do pico corresponde a 97% da soma das áreas de todos os picos detectados. Não foi possível realizar a identificação dos outros picos devido à baixa intensidade, comparável ao nível de ruído do equipamento.



Figura 8. Cromatograma de bixina após purificação. Tempo de corrida: 25 minutos.

Atualmente não existem padrões de referência para bixina disponíveis comercialmente. No entanto, o equipamento utilizado na análise possui um detector com arranjo de fotodiodos, que nos permitiu realizar varreduras de 300-600 nanômetros em tempo real, tornando possível a identificação da bixina através de seu espectro de absorção, como observado na porção superior da Figura 8.

4.1.3 Identificação do isômero de bixina

Carotenoides como a bixina e seus isômeros podem ser identificados por meio de características de seu perfil espectrofotométrico, particularmente a posição dos picos de absorção, a estrutura fina espectral calculada e a intensidade relativa do pico *cis* (BRITTON, 1995).

A estrutura fina (%III/II) em porcentagem é expressa como a razão entre as alturas relativas dos picos característicos dos carotenoides, considerando como referência o vale entre eles. O "pico *cis*" é uma banda de absorção localizada em torno de 142 nm abaixo do máximo de absorção e está relacionado à conformação *cis* da molécula (BRITTON, 1995).

Os máximos de absorção de bixina em clorofórmio utilizada neste trabalho são semelhantes aos encontrados na literatura, listados no quadro 6. Adicionalmente, REITH e GIELEN (1971) determinaram que esses máximos de absorção se referem à *cis*-bixina, o que foi posteriormente confirmado por SCOTTER et al. (1994), em estudos cromatográficos.

Conforme espectros nas Figuras 7 e 8, a bixina utilizada neste trabalho apresentou o pico *cis*, porém não tão pronunciado, mas está em consonância com a maioria dos valores encontrados nos estudos de SCOTTER et al. (1994) e MONTENEGRO et al. (2004), resumidos na Tabela 3. A intensidade relativa do pico *cis* (%A₃₆₅/A₄₇₀) foi calculada, tomando-se a razão entre o pico *cis* (365 nm) e a absorção máxima, a 470 nm.

Fonte dos dados	Isômero	% A365/A470	% /	REL III/II*	
Experimental		11,4	60	89,6	
SCOTTER et al.,	Trans-bixina	9	-	91	
1994	<i>Cis-</i> bixina	12	-	89	
MONTENEGRO et	Trans-bixina	0	39	-	
al., 2004	Cis-bixina	5	40	-	

Tabela 3. Comparação dos dados espectrais da bixina obtidos experimentalmente com os valores encontrados na literatura.

*O autor utiliza a absorção total dos picos para determinação da estrutura fina e não as alturas relativas ao vale entre eles.

Chamou atenção o resultado de 60% para %III/II da bixina, pois a literatura relata valores abaixo de 50%, usualmente em torno de 40%. Apesar deste fato, os demais parâmetros espectrofotométricos, além de morfologia e ponto de fusão dos cristais, foram compatíveis com os dados de outros pesquisadores (JUÁREZ, 2005; LEVY E RIVADENEIRA, 2000; REITH & GIELEN, 1971), sobretudo aqueles resultantes dos estudos de SCOTTER (1994;2009).

Sendo assim, consideramos que nossa amostra é composta majoritariamente de *cis*-bixina e o valor de $E_{1\%}^{1cm}$ = 3092 a 470 nm foi adotado para a determinação de seu teor.

4.2 Caracterização da dispersão de bixina

4.2.1 Preparo da dispersão

O material obtido após purificação foi utilizado para preparação da dispersão pelo método de injeção etanólica. Uma solução de bixina a 0,55 mmol/L foi preparada em etanol e posteriormente 1 mL desta solução foi injetada em 9 ml de água ultrapura.



Figura 9. Modificações na aparência da dispersão bixina: (A) imediatamente após a injeção e (B) 60 minutos após a injeção.

Curiosamente, foi observada uma leve fluorescência nesta amostra, embora não seja possível notar na figura 9. Segundo DIAS e colaboradores (2008), a bixina solubilizada em clorofórmio exibe fluorescência, pico de emissão na faixa dos 550-650 nm. No entanto, ainda não foi possível determinar por qual motivo houve aumento da fluorescência quando da formação das partículas. O inverso seria esperado para este sistema, visto que com a aglomeração das moléculas estas estariam menos disponíveis para interação com a luz, tanto a radiação absorvida quanto a emitida.

Imediatamente após a injeção, a dispersão adquiriu aspecto totalmente translúcido, mantendo a cor alaranjada característica da bixina, como pode ser observado na Figura 9A. Transcorridos cerca de 30 minutos, a dispersão adquiriu um aspecto turvo, com atenuação do tom alaranjado. A turbidez observada foi atribuída à formação de partículas, uma vez que há uma interação com a luz incidente.

Há uma correlação entre a turbidez de um sistema coloidal e o diâmetro das partículas que estão dispersas, descrita pela Lei de Joebst (JOEBST, 1925). Aparentemente, ocorreu um aumento tempo-dependente no diâmetro das partículas. Entre os processos que podem causar este crescimento estão a coalescência, agregação e envelhecimento Ostwald (HUBBARD, 2004).

Este comportamento foi investigado através de espectrofotometria. Foram realizadas sucessivas varreduras em intervalos de tempo regulares,



ilustrado na Figura 10. Os espectros foram separados em blocos para facilitar a visualização e interpretação.



Figura 10. Espectros de varredura obtidos para a dispersão de bixina ao longo de 180 minutos. (A) Visualização geral dos espectros no período total de observação. Espectros obtidos nos tempos de (B) 1 a 10 minutos, (C) 10 a 40 minutos, (D) 40 a 180 minutos.

Na Figura 10 pode ser observado o comportamento espectrofotométrico da dispersão ao longo de 3 horas. Foram observadas 3 fases de mudança da

curva, que ocorreram, respectivamente, nos primeiros 10 minutos, dos 10 aos 40 minutos e dos 40 minutos até o final de 180 minutos.

A curva apresentada em preto no gráfico (B) corresponde à primeira leitura da dispersão. Foi observado um pico em 392 nm, que diminuiu proporcionalmente ao aumento de um pico localizado em torno de 354 nm. O pico formado em 354 nm atingiu seu máximo ao final de 10 minutos, quando começou a decrescer. O pico teve seu decréscimo estabilizado quando transcorridos 40 minutos da injeção, concomitantemente a um "achatamento" de todo o perfil espectrofotométrico. O perfil se manteve constante a partir daí, ocorrendo apenas uma diminuição dos valores de absorbância.

As mudanças ocorridas no espectro de absorção evidenciam fenômenos básicos que ocorrem nas dispersões. O primeiro deles, caracterizado pela mudança no perfil, está relacionado à cinética de formação e estabilização das partículas. Estas interagem entre si, causando alterações em sua dimensão (DERJAGUIN; LANDAU, 1941; VERWEY; OVERBEEK, 1948).

Na comparação do perfil de absorção da bixina em clorofórmio (Figuras 7 e 8) com a dispersão de bixina (Figura 10), nota-se que no primeiro praticamente inexiste absorção na região 300-400 nm, ao passo que no segundo, há um pico de absorção. Portanto, podemos atribuir o surgimento de absorção neste intervalo à auto associação das moléculas de bixina.

O perfil do espectro UV/Vis, depende da dispersão de luz causada pelas partículas e da absorção inerente à estrutura eletrônica das moléculas. A contribuição de cada um desses fenômenos dependerá diretamente das características da nano partícula, como tamanho, forma, composição e estado de agregação (BOHREN, 1998). De maneira geral, para partículas pequenas, o efeito de dispersão da luz é pequeno, em relação ao comprimento de onda incidente, predominando a absorção. Para partículas grandes, a relação se inverte.

A partir do exposto acima e para facilitar a análise, pode-se considerar que, no perfil espectrofotométrico da bixina dispersa, no intervalo 300-400 nm predomina a dispersão de luz, enquanto de 400 a 600 nm a absorção deve ser o principal fenômeno.

O aumento da turbidez com o decorrer do tempo observado na Figura 9 e a variação nos espectros de absorção visto na Figura 10 são evidências do

33

efeito de agregação das partículas. Tanto a diminuição do pico 300-400 nm, quanto o "alargamento" do espectro e aumento da linha de base, são característicos da agregação de partículas (BOHREN, 1998).

Diferentemente, a partir de 400 nm, onde predominam os efeitos de absorção, não foram observadas diferenças significativas entre os espectros obtidos em 180 minutos, exceto por uma diminuição na intensidade da absorção, provavelmente relacionado à própria degradação da molécula de bixina causada pela luz (BALASWAMY, 2006).

No decorrer da análise, a dispersão foi mantida ao abrigo da luz, porém, como a técnica espectrofotométrica baseia-se na incidência de um feixe luminoso sobre a amostra, isto pode ter ocasionado degradação das moléculas. Cada varredura espectral demandou cerca de 20 segundos para ser completada. Considerando que foram realizadas 38 varreduras sobre a mesma amostra, temos que a amostra ficou exposta à luz pelo tempo total de 12,7 minutos.

De fato, NAJAR e colaboradores (1988), identificaram a incidência luminosa como a maior causa de degradação da molécula de bixina, mesmo quando comparada ao peróxido de benzoíla ou oxigênio puro que também são agentes promotores de degradação.

5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

A dispersão de bixina foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. Uma pequena gota foi aplicada na superfície de uma lâmina de silício, seguida por secagem a vácuo. A seguir, foi depositada uma camada de 14 nm de espessura de átomos ouro para melhorar a condutividade da amostra e assim facilitar a visualização.

Como observado na figura 11, as amostras apresentaram um aspecto de aglomerado, tornando difícil a visualização individual das partículas. Isto foi atribuído ao processo de secagem gradativa após a aplicação da amostra e à medida que a água evapora, a dispersão torna-se cada vez mais concentrada, diminuindo o espaço entre as partículas, favorecendo a agregação. Isto faz com que ao final da secagem, as partículas estejam quase que completamente agregadas.



Figura 11. Micrografias eletrônicas de varredura de bixina I. Aplicação de amostra pelo método de evaporação de gota. Aumento de 40000 e 150000 vezes, respectivamente, esquerda e direita.

Para minimizar este efeito, novo material foi preparado e a lâmina foi imersa diretamente na suspensão durante alguns segundos. Desta forma, foi esperado que uma proporção maior das partículas em suspensão ficasse aderida à superfície da lâmina, de modo que não fosse necessária a secagem. As imagens obtidas pela aplicação das amostras por imersão mostraram-se significativamente menos agregadas, conforme ilustrada na Figura 12.



Figura 12. Micrografias eletrônicas de varredura de bixina II. Aplicação de amostra por imersão da lâmina. Aumento de 20.000 (esquerda) e 80.000 vezes (direita).

4.2.3 Determinação do diâmetro da partícula

Uma determinação do diâmetro médio das partículas foi realizada com o uso da técnica *Nanoparticle Tracking Analysis* – NTA. Esta se baseia no

acoplamento de um ultramicroscópio com iluminação a laser a um CCD (*Charged Coupled Device*). As partículas em movimento browniano são acompanhadas individualmente e correlacionando a intensidade da luz dispersada com a taxa de movimentação das partículas, é possível determinar seu diâmetro.



Figura 13. Imagem de partículas de bixina dispersas em água obtidas pelo equipamento Nanosight NS-300.

A Figura 13 mostra a tela de visualização das partículas. Deve-se observar que o formato circular produzido pelo equipamento, porém, não reflete necessariamente a morfologia real da partícula. O sensor apenas recebe a luz refratada pela partícula, interpretando-as como um ponto luminoso, daí o formato mostrado na tela. (CARR; WRIGHT, 2013).

As partículas exibiram uma distribuição bimodal em seu diâmetro médio, sendo que houve uma população centrada em 75 nm e outra em 107 nm. No entanto, houve uma sobreposição entre essas duas populações, de modo que o diâmetro médio das partículas foi de 103 nm.



Figura 14. Relatório de análise gerado pelo software para a amostra de bixina.

A dispersão de bixina também foi analisada pela técnica de difusão dinâmica da luz, ou no original em inglês, *Dynamic Light Scattering* (DLS). O uso do DLS para análise de partículas em escala nanométrica encontra-se bem estabelecido. Esta técnica baseia-se no fato de que partículas suficientemente pequenas, de tamanho comparável ao comprimento de onda, interagem com a luz, dispersando-a em todas as direções.

No entanto, se a luz incidente for coerente e monocromática, então é possível observar flutuações na intensidade dessa dispersão, uma vez que as partículas na solução estão em movimento browniano e as ondas luminosas também interagem entre si de forma construtiva ou destrutiva. Portanto, a variação na intensidade da dispersão da luz neste sistema contém informações acerca da dinâmica das partículas, que podem ser extraídas através de uma função de autocorrelação.

O diâmetro das partículas determinado através da técnica DLS foi bastante parecido com o determinado pela técnica NTA. Para a análise, foi utilizado um equipamento da fabricante Malvern[®] Zetasizer Nano ZS. Os dados obtidos no equipamento estão representados nas Figuras 15 e 16.



Figura 15. Visualização da tela do software de análise de diâmetro de partículas da dispersão de bixina pela técnica de espalhamento dinâmico da luz.



Figura 16. Análise de potencial Zeta das partículas da dispersão de bixina.

As partículas de bixina apresentaram diâmetro médio de 73 nm, próximo ao valor determinado pela técnica NTA, também em distribuição bimodal. Todavia, as populações foram centradas em 20 nm e 150 nm, o que conferiu um índice de polidispersidade de 0,536. O potencial Zeta das partículas foi de -24±7 mV.

4.2.4 Efeito do NaCl sobre o preparo e estabilidade da dispersão de bixina

A dispersão de bixina foi avaliada nas concentrações de NaCI nos valores de 1, 10, 25, 50, 100, 200 e 300 mmol/L. Os espectros foram obtidos imediatamente após a preparação das dispersões e encontram-se na figura 17:



Figura 17. Perfis espectrofotométricos da dispersão de bixina em soluções de NaCl. Em (A), dispersão foi formada diretamente em solução salina. Em (B), a dispersão foi preparada em água e posteriormente diluída em solução salina.

Na figura 17A, estão reunidos os perfis espectrofotométricos das dispersões de bixina formadas diretamente em solução salina. A parte B corresponde às partículas de bixina formadas primeiramente em água ultrapura e posteriormente diluídas em solução salina.

Na figura 17A, vemos que a concentração salina teve um grande impacto na formação da dispersão. Na concentração salina de 1,0 mmol/L, o espectro obtido se assemelhou bastante àquele obtido na ausência de NaCl, com uma absorção bastante pronunciada na região de 380 nm. No entanto, à medida que a concentração salina foi aumentada, houve um deslocamento batocrômico do máximo de absorção de cerca de 40 nm, acompanhado de um achatamento no aspecto geral do perfil de absorção. O perfil se manteve constante a partir daí, ocorrendo apenas uma diminuição dos valores de absorbância.

Este padrão de mudança foi semelhante ao observado quando se realizou o acompanhamento das alterações nos perfis espectrofotométricos ao longo de 3 horas, representado na Figura 10. É interessante notar que concentrações salinas a partir de 50 mmol/L, promoveram efeitos com perfil comparável ao que foi observado 1 hora após a formação da dispersão. O mesmo raciocínio utilizado na análise da formação das partículas de bixina no item 5.2.1 pode ser aplicado aqui. As mudanças nos perfis dos espectros indicaram aumento no diâmetro das partículas formadas. Da mesma maneira, as alterações espectrofotométricas foram acompanhadas por mudanças na aparência da dispersão, como ilustrado na Figura 18.



Figura 18. Aspecto das dispersões de bixina em soluções de NaCl de 1 mMol/L a 300 mMol/L.

A dispersão se manteve estável em concentrações de até 50 mmol/L de NaCI, enquanto que em 100 mmol/L foi observado um significativo aumento na turbidez.

Nas concentrações de 200 e 300 mmol/L, o sistema se tornou bastante instável. À primeira vista, o aspecto um pouco mais límpido da dispersão sugeriu o contrário, mas em uma análise mais cuidadosa, foi possível perceber que a limpidez se devia à menor concentração de bixina na fase aquosa, uma vez que parte dela se precipitou para o fundo do tubo.

O maior tamanho das partículas observado pode ser atribuído ao efeito de blindagem, causado pelo NaCl (CARMONA-RIBEIRO; HIX, 1991). De forma geral, há duas forças que concorrem entre si e determinam o grau de agregação das partículas: a tendência à fusão de bicamadas de duas

partículas pela interação hidrofóbica e a repulsão eletrostática causada pelas cabeças polares.

Os íons Na⁺ fornecidos ao meio pelo NaCl pareiam-se ao carboxilato das cabeças polares da bixina, neutralizando ("blindando") sua carga. Desta forma, a carga elétrica da superfície das partículas de bixina tende à neutralidade com o aumento da concentração de NaCl no meio, aumentando a tendência à agregação (DERJAGUIN; LANDAU, 1941; VERWEY; OVERBEEK, 1948).

A figura 17B, onde estão presentes os perfis obtidos da dispersão formada em ambiente isento de sais e posteriormente diluídas em soluções salinas, mostra um comportamento diferente do primeiro caso. Não houve diferenças tão significativas como naquele, nem ocorreu precipitação de bixina no fundo do tubo.

Este comportamento deverá ser melhor investigado futuramente, porém, deve-se considerar que a teoria DLVO possui algumas limitações, pois foi originalmente proposta para sistemas coloidais de partículas rígidas. Outras forças devem ser consideradas no estudo da estabilidade de partículas mais fluidas, como demonstrado por SABIN e colaboradores (2006). Os autores determinaram que a estabilidade de lipossomas de fosfatidilcolina é melhor descrita por um modelo extendido da teoria DLVO. Este modelo considera a ação da força de hidratação e osmótica e que a superfície da partícula pode se deformar, além de intercambiar moléculas de água entre interior e exterior.

4.2.5 Efeito do pH sobre o preparo e estabilidade da dispersão de bixina

A dispersão de bixina foi preparada em soluções com pH variando de 1 a 13, ajustado com HCI ou NaOH. À maneira do que foi realizado no item anterior, o comportamento da dispersão foi analisado em duas situações: a) influência do pH na formação da dispersão e b) se as partículas já estão formadas, se manterão sua integridade quando introduzidas em meios ácidos ou alcalinos. A figura 19 mostra o impacto do pH na formação da dispersão. Os espectros de absorção foram obtidos imediatamente após a injeção da solução etanólica de bixina nas soluções de HCI ou NaOH.



Figura 19. Espectros de bixina obtidos em função da variação de pH. Na legenda, estão relacionados o pH das dispersões depois da injeção de bixina, entre parênteses o pH original.

Neste caso, foi observado um efeito semelhante ao "tamponamento" causado pela bixina injetada nas soluções alcalinas na faixa de pH 7,0-10,0. Isto pode ser provavelmente devido ao grupo ácido carboxílico presente em uma das terminações da molécula, que atua como doador de prótons aos íons hidróxidos da solução.

Porém, a partir desta faixa, o grupo éster da bixina começa a sofrer hidrólise, o que foi reconhecido pelo surgimento de perfil espectrofotométrico característico de norbixina. Em verdade, a hidrólise de bixina por bases fortes é um método bastante utilizado na quantificação e extração de bixina (SCOTTER, 2009). Uma comparação entre os perfis de absorção da bixina e norbixina pode ser observada na Figura 20.



Figura 20. Comparação entre os espectros de bixina e norbixina. Picos de absorção da norbixina em 453 e 483 nm. Fonte: LEVY E RIVADENEIRA (2000).

O pico 300-400 nm variou com a estabilização das partículas, e assim, sofreu alterações com o aumento do pH, conforme mostrado na Figura 21. Bastante achatado em meios ácidos, tornou-se mais bem resolvido à medida que se aproximou de pH 6,0. O gráfico à direita da figura 21 mostra a absorção em 390 nm de cada amostra. As amostras com valores de pH acima de 6,0 não foram plotadas, pois tratam-se de norbixina solúvel.



Figura 21. Espectros de absorção de dispersões de bixina em função da variação de pH (A) e valores de absorção em comprimento de onda fixo de 390 nm (B). Método de injeção direta. Concentração de bixina: 50 µmol/L.

Quando as partículas foram formadas em ambiente neutro e posteriormente adicionadas às soluções ácidas ou alcalinas, não foram observadas mudanças significativas no espectro de absorção. Os picos mantiveram o mesmo perfil em todos os valores de pH testados, exceto a partir de pH=10, em que houve hidrólise de bixina, formando norbixina. Os espectros podem ser observados na figura 22.



Figura 22. Espectros de absorção das dipersões de bixina após diluição em soluções nos extremos de pH. Método de diluição da dispersão. Bixina na concentração fixa de 50 µmol/L.

4.2.6 Determinação da concentração crítica de agregação daspartículas de bixina

Segundo ISRAELACHVILI (2011), a menor concentração de monômeros em que moléculas começam a se associar para formar estruturas organizadas pode ser chamada de concentração crítica de agregação (*Critical Aggregation Concentration* – CAC), embora seja tradicionalmente mais comum o uso do termo Concentração Micelar Crítica (*Critical Micelle Concentration* – CMC) para indicar a concentração crítica de todas as estruturas ao se auto-associarem.

Tais estruturas podem assumir diversas formas como micelas, micelas invertidas, discos, bicamadas planas, vesículas, entre outras. Esta autoorganização ocorre guiada por componentes termodinâmicos e entrópicos, com a finalidade de minimizar a interação entre as cadeias apolares e as moléculas do solvente aquoso, uma vez que essas interações são desfavoráveis.

A concentração crítica de agregação pode ser determinada monitorandose o comportamento da solução à medida em que a concentração do tensoativo é aumentada. Quando as moleculas começam a se auto-associar, é possível observar uma variação brusca na tendência de alguma propriedade físico-química da solução (ISRAELACHVILI, 2011).

A bixina possui uma estrutura molecular anfifílica que se assemelha aos tensioativos, se considerarmos que a terminação em ácido carboxílico constitui uma cabeça polar, enquanto sua cadeia com duplas ligaçoes conjugadas forma uma cauda apolar. Devido ao fato da bixina formar partículas em água, é razoável supor que estas se formam a partir de auto-associação e que é possível determinar a concentração crítica para que isso ocorra.

Em um primeiro momento, foram obtidos os espectros de abosorção da bixina em água em uma ampla faixa de concentração, a fim de rastrear a concentração crítica de agregação. Foram realizadas leituras de bixina em água desde 1 µmol/L, a menor concentração que pode ser detectada no equipamento, até 50 µmol/L, a maior concentração de bixina que pode ser obtida estavelmente em água.

Como observado na Figura 23, nenhum dos espectros apresentou o perfil de bixina solúvel, mas similares àqueles observados na Figura 10. Devido ao fato de que a leitura no espectro foi obtida tão logo a bixina foi adicionada à agua, os perfis foram idênticos àquele observado no T₁ da Figura 10.



Figura 23. Espectro de absorção de bixina em função da sua concentração em água (1 a 50 µmol/L).

Valores de absorção a 406 nm e a 530 nm foram utilizados como referência para correlacionar a concentração e absorção (Figura 24). Os dados permitem observar um pequeno platô entre as concentrações de 5 a 10 µmol/L, no entanto, não foi possível determinar a concentração molar crítica para agregação.



Figura 24. Valores de absorção de bixina em função de sua concentração para comprimentos de onda fixos de 406 e 530 nm.

A seguir, os estudos foram conduzidos utilizando técnicas de tensiometria e condutivimetria.

Em baixas concentrações, as moléculas tensioativas encontraram-se em equilíbrio entre a solução e parte adsorvidas na interface líquido-ar. À medida concentração foi tensão que а elevada, а superficial diminuiu proporcionalmente, devido ao aumento de moléculas na interface líquido-ar. Porém, a partir do ponto de saturação da interface, a adição de mais tensioativo teve pouco efeito sobre a tensão superficial, pois as moléculas adicionadas se auto-associaram e ficaram suspensas na fase líquida. A concentração em que isso ocorreu se traduziu graficamente como um ponto de inflexão.



Figura 25. Efeito das concentrações de bixina sobre a tensão superficial das dispersões. Variação da concentração de bixina de 2,5 a 40 µmol/L.

De maneira análoga, a condutividade de uma solução de tensoativo aumentou proporcionalmente com a elevação de sua concentração até o ponto de saturação, devido à maior disponibilidade de moléculas em solução. Contudo, a partir da concentração crítica de agregação, a condutividade sofreu pouca variação devido à formação de partículas.

47



Figura 26. Efeito da variação das concentrações de bixina sobre a condutividade das dispersões. Faixa de concentração de 0,25 a 40 µmol/L.

Conforme figuras 25 e 26, não foi observado nenhum ponto de inflexão nos gráficos de tensão superficial e condutivimetria. Na análise tensiométrica houve ligeira diminuição na tensão superficial, porém não pode ser considerada formação de agregados. A título de comparação, a adição de dodecilsulfato de sódio à água pura a 25°C até atingir a concentração micelar crítica causou uma queda de cerca de 30 dyn/cm na tensão superficial.

A análise condutivimétrica mostrou resultado incompatível para o que se esperava de um sistema auto-associativo. A adição de bixina à solução causou pouco ou praticamente nenhum efeito na condutividade até a concentração de 10 µmol/L. A partir desta concentração, a condutividade aumentou proporcionalmente à concentração de bixina.

4.2.7 Aplicação da dispersão de bixina como carreadora do fármaco daunorrubicina

Capacidade carreadora da dispersão de bixina foi avaliada pelo ensaio de inibição de proliferação de células da linhagem A549, derivada de carcinoma pulmonar humano. A atividade antiproliferativa da daunorrubicina livre foi comparada à da daunorrubicina associada à dispersão de bixina.

Uma das razões pela qual os sistemas carreadores de fármacos são utilizados é a possibilidade de diminuir a dose sem prejuízo na atividade. Isto porque os carreadores podem tanto aumentar a absorção da molécula pela célula alvo, quanto protegê-la dos mecanismos de metabolismo celular (TORCHILIN, 2005).

A daunorrubicina (Figura 27) é um fármaco da família das antraciclinas, utilizada contra uma variedade de tumores, mas sobretudo no tratamento de leucemias. Age por intercalação ao DNA da célula-alvo, impedindo a replicação celular. Seu uso é limitado pela sua elevada citotoxicidade, que causa efeitos adversos como mielosupressão e cardiotoxicidade (GEWIRTZ, 1999).



Figura 27. Estrutura molecular da daunorrubicina.

Atualmente estão disponíveis no mercado os medicamentos DaunoXome[®] e Doxil[®], formulações lipossomais de daunorrubucina e doxorrubicina, respectivamente.

A incorporação de fármacos derivados da antraciclina, como daunorrubucina e doxorrubicina, apresentam melhorias na farmacocinética, eficiência na entrega do fármaco ao tecido alvo e redução nos efeitos adversos (GILL et al, 1995; SAFRA et al, 2000; SAFRA et al, 2003).

Segundo os autores, as antraciclinas lipossomais proporcionaram maior nível plasmático e maior área sob a curva (AUC), além de sofrer metabolização mais lenta, em comparação com os fármacos livres.

A encapsulação diminui a absorção do fármaco pelas células normais não-reticuloendoteliais e a ligação às proteínas plasmáticas, aumentando o tempo de circulação no plasma. Somado a isso, houve um maior extravasamento do fármaco encapsulado na vasculatura das regiões próximas ao tumor. Logo, houve uma acumulação do fármaco lipossomal no tecido tumoral (FASSAS & ANAGNOSTOPOULOS, 2005; PEA et al, 2000; RAHMAN et al, 1985).
Foram preparadas dois grupos de 5 concentrações-teste de daunorrubicina. No primeiro grupo, a daunorrubicina foi solubilizada normalmente em água ultrapura, nas concentrações desejadas. No segundo grupo, a solução de daunorrubicina sofreu adição de 1 mL de solução etanólica de bixina, à maneira do preparo da dispersão e respeitando-se o volume e concentrações finais. Como controles negativo e positivo para morte celular, foi utilizado meio de cultura DMEM fresco e solução de DMSO a 10%, respectivamente. Uma amostra contendo apenas a dispersão de bixina foi incluída, a fim de controlar a atividade da bixina *per se*.

A Figura 28 apresenta viabilidade celular após interação com diversas preparações a partir de daunorrubicina.



Figura 28. Viabilidade celular da linhagem A549 após interação por 24 horas com preparações de daunorrubicina.

Legenda:

DAU* = daunorrubicina livre em solução aquosa;

DAUBX* = Daunorrubicina associada à dispersão de 0,1 mmol/L de bixina. *O número corresponde à concentração de daunorrubicina em µg/mL.

Controles: DMSO10% = Solução aquosa de DMSO a 10%; Branco = Meio de cultura fresco; BX01 = Dispersão de bixina a 0,1 mmol/L MATUO (2012) demonstrou que concentrações de bixina até 0,25 mmol/L não provoca efeito tóxico considerável em células da linhagem A549, mesmo quando submetidas a interações por até 48 horas. Neste trabalho, optou-se por trabalhar com concentração do composto de 0,1 mmol/L para incorporação de fármacos e assim, garantir a não interferência na viabilidade celular. Esta mesma concentração de bixina também foi utilizada como controle nos ensaios realizados.

A viabilidade celular foi avaliada após 24 horas de interação entre as células e as dispersões-teste e os resultados estão apresentados na figura 28. Pode-se verificar que bixina praticamente não teve influência na porcentagem de inibição da proliferação de células da linhagem A549 e que, portanto, a queda na viabilidade celular se deveu somente na presença dos fármacos.

Quando fármacos foram submetidos juntamente com bixina, a queda na viabilidade celular foi mais acentuada em comparação com os fármacos isolados, sugerindo que o aumento na atividade se deveu a algum tipo de interação sinérgica entre fármaco e bixina.

Embora não tenha sido possível determinar a morfologia das partículas de bixina, algumas hipóteses puderam ser elaboradas. Foi verificado que a partir da concentração de 10 µmol/L de daunorrubicina, as partículas começaram a se modificar de forma considerável, como exposto na Tabela 4:

Concentração		
daunorrubicina adicionada	Diâmetro médio (nm)	Potencial Zeta (mV)
(µM)		
0	82	-26,8
1	134	-24,5
10	421	-13,8
20	3042	-1,16

Daunorrubicina em pH neutro possui carga positiva, resultado da protonação do grupamento amina (O'NEIL, 2006), porém, o potencial Zeta das partículas tornou-se menos negativo à medida que a daunorrubicina foi

51

adicionada à dispersão de bixina. Ao mesmo tempo, o diâmetro médio das partículas sofreu aumento, sendo consistente com uma interação das moléculas de daunorrubicina com as partículas de bixina.

Como demonstrado na Figura 28, daunorrubicina possui, além das regiões de alta densidade eletrônica que conferem certa solubilidade, regiões de baixa densidade eletrônica que podem se ligar a bixina por interação hidrofóbica.



Figura 29. Mapa de potencial eletrostático de fármacos policíclicos, incluindo a daunorrubicina (daunomicina). Fonte: SUBRA et al., 2012

O efeito observado na interação entre daunorrubicina e bixina é similar ao demonstrado por PACHECO E CARMONA-RIBEIRO (2002) em que as interações hidrofóbicas fármaco-surfactante foram as responsáveis pela estabilidade de agregados formados de miconazol associado a fragmentos de bicamada lipídica de DODAB ou DHP. Os autores verificaram que, em baixa proporção fármaco/lípide, as moléculas de miconazol adsorvem às bordas das bicamadas ao passo que na situação inversa as partículas de fármaco são recobertas por fragmentos de bicamada.

No entanto, não pode ser descartado outro tipo de associação entre a partícula da dispersão de bixina e a molécula de daunorrubicina, como a formação de microcristais constituídos pelas duas moléculas ou simplesmente a adsorção da daunorrubicina à superfície das partículas, como relatado por FREZARD e colaboradores (2005). O conhecimento da eficiência da

encapsulação do fármaco por dado sistema carreador, assim como a relação lipídeo/fármaco, é muito importante no desenvolvimento de um sistema de carreamento. A otimização dos parâmetros de encapsulação pode ser realizada através de modificações no método de preparação, resultariam em ganhos do ponto de vista terapêutico pela menor quantidade de lipídeos e fármaco utilizados e assim, menor o risco de desenvolvimento de efeitos adversos.

Os valores de potencial Zeta e tamanho das partículas da dispersão não têm apresentado variações significativas durante o seu armazenamento por um período de três meses (estudo de estabilidade em andamento).

5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento de formulações nanotecnólogicas ampliaram o escopo de aplicações possíveis dos extratos das sementes do urucum além da função de corantes e antioxidante.

A dispersão de bixina possui potencial para o desenvolvimento de um sistema carreador de fármacos. Esta apresentou estabilidade em uma ampla faixa de pH e concentração de NaCl, além de aumentar a atividade do fármaco sem desenvolver efeito citotóxico.

Mesmo com os resultados obtidos, ainda persiste controvérsia quanto a caracterização físico-química dos isômeros de bixina.

Mais estudos são necessários para determinar a estrutura das partículas que formam a dispersão de bixina, para otimizar a incorporação de fármacos às partículas.

A elucidação dos mecanismos de ação biológica da bixina deverá abrir novas frentes para a exploração dos extratos da semente do urucum.

6 PERSPECTIVAS

A partir do exposto neste trabalho, consideramos que a bixina apresenta um grande potencial de aplicação na área farmacêutica. Além de sistema carreador de fármacos, a elucidação dos mecanismos de ação biológica coloca-se como um campo promissor. Sobretudo aqueles relacionados ao controle do metabolismo e genoproteção, uma vez que as doenças crônicas não transmissíveis são importante causa de mortalidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAZAWA, D.; DATE, T.; MORIKAWA, K.; MURAYAMA, A.; MIYAMOTO, M.; KAGA, M.; BARTH H.; BAUMERT T. F.; DUBUISSON, J.; WAKITA, T. CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, v.81, p.5036-5045, 2007.
- ALI, I.; UDDIN, R.; SALIM, K.; RATHER, M.A.; WANI, W.A.; HAQUE, A. Advances in nano drugs for cancer chemotherapy. *Current Cancer Drug Targets*, v.11, p.135-146, 2011.
- BATZRI, S.; KORN, E.D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.298, p.1015-1019, 1973.
- BALASWAMY K.; PRABHAKARA RAO P.G.P.; SATYANARAYANA A.; RAO D.G. Stability of bixin in annatto oleoresin and dye powder during storage. *LWT Food Science and Technology*. v.39, p.952–956, 2006.
- BERRIDGE, M.V.; TAN, A.S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.303, p.474-482, 1993.
- BOHREN, C.F.; HUFFMAN, D.R. Absorption and scattering of light by small particles. John Wiley & Sons, Nova York, 1998.
- DIAS, V.M.; ALVES, P.L.; MUNIN, E.V.P. Caracterização óptica de Bixina Extraída de Sementes de Urucum. In: XII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, São José dos Campos, 2008

BOUSSINGAULT, J.B. Annales de Chimie et de Physique, 28, 440-444, 1825.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011. Disponível http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf

- BRITTON, G. UV/visible spectroscopy. In Carotenoids Vol. 1B: Spectroscopy; Britton, G., Liaaen-Jensens, S., Pfander, H., Eds.; Birkhauser Verlag: Basel, Switzerland, 1995, 13-62.
- CARMONA-RIBEIRO, A. Biomimetic nanoparticles: preparation, characterization and biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*, v.5, p.249-259, 2010.
- CARMONA-RIBEIRO, A.; HIX, S. pH effects on properties of dihexadecyl phosphate vesicles. *The Journal of Physical Chemistry*, v.14, p.1812-1817, 1991.
- CARRION, F.; MAZA, A. D. LA; PARRA, J. The influence of ionic strength and lipid bilayer charge on the stability of liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.164, p. 78-87, 1994.
- CHISTÉ, R.C.; MERCADANTE, A.Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J.L.F.D.C.; BRAGAGNOLO, N. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, v.127, p.419-426, 2011.
- DERJAGUIN, B.; LANDAU, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes, *Acta Physico Chemica (URSS)*,v.14, p.633-622, 1941.
- DE-OLIVEIRA, A.C.A.X.; SILVA, I.B.; MANHÃES-ROCHA, D.A.; PAUMGARTEN, F.J.R. Induction of liver monooxygenases by annatto and bixin in female rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.36, p.113-118, 2003.
- FABRI, E.G; TERAMOTO, J.R.S. Urucum: fonte de corantes naturais. *Horticultura Brasileira*, v. 33, n. 1, p. 140, 2015.
- FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 63, n. 3, p. 136-51, 2011.

FAO/WHO, Food and nutrition paper 25, FAO, Rome, 1982.

- FASSAS, A., & ANAGNOSTOPOULOS, A. The use of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in acute myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, v. 46, n.6, p.795-802, 2005.
- FERREIRA, V.L.P.; TEIXEIRA-NETO, R.O.; MOURA, S.C.S.R.; SILVA, M.S. Cinética da degradação da cor de solução hidrossolúvel comercial de urucum, submetida a tratamentos térmicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.19, p.37-42, 1999.
- FILION M.C.; PHILLIPS N.C.; Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1329, p.345–356, 1997.
- FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A.; ROCHA, O.G.F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova*, v.28, n.3, p.511-518, 2005.
- GALINDO-CUSPINERA, V.; RANKIN, S.A. Bioautography and chemical characterization of antimicrobial compound(s) in commercial water-soluble annatto extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.2524-2529, 2005.
- GALINDO-CUSPINERA, V.; WESTHOFF, D.C.; RANKIN, S.A. Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage microorganisms. *Journal of Food Protection*, v.66, p.1074-1078, 2003.
- GEWIRTZ, D. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, v.57, p.727-741, 1999.
- GIARD, D.J. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, v.51, p.1417-1423, 1973.
- GRIT, M.; CROMMELIN, D. J. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.64, p.3-18, 1993.
- HARA M.; YAMANO Y.; SAKAI Y.; KODAMA E.; HOSHINO T.; ITO M.; MIYAKE J. Stabilization of liposomal membranes by carotenoids: zeaxanthin,

zeaxanthin glucoside and thermozeaxanthin. *Material Science and Engineering C*, v.28, p.274-279, 2008.

- HEO, D.S.; PARK, J.G.; HATA, K.; DAY, R.; HERBERMAN, R.B.; WHITESIDE, T.L. Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity. *Cancer Research*, v.50, p.3681-3690, 1990.
- HUBBARD, ARTHUR T. Encyclopedia of Surface and Colloid Science. CRC Press. p. 4230. 2004
- IROBI, O. N.; MOO-YOUNG, M.; ANDERSON, W. A. Antimicrobial activity of annatto (*Bixa orellanna* L) extract. *Pharmaceutical Biology*, v.34, p.87-90, 1996.
- ISRAELACHVILI, J.N. Intermolecular and surface forces: revised third edition. 3 ed. Londres, Academic Press, 2011.
- JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants. Twenty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Technical Report Series, n. 683, 1982.
- JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; MURRAY, T. Cancer statistics, 2008. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v.58, p.71-96, 2008.
- JOBST, G. Zur Farbentheorie kolloidaler Metallsuspensionen. Annalen der Physik (Leipzing). v.76, p863, 1925.
- KARRER, P.; JUCKER, E. Carotenoids. Elsevier Publishing Company Inc., 384 p., 1950.
- KATO, T.; MATSUMURA, T.; HELLER, T.; SAITO, S.; SAPP, R. K.; MURTHY, K.; WAKITA, T.; LIANG, T. J. Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *Journal of Virology*, v.81, p.4405-4411, 2007.
- KIKUCHI, I.; CARMONA-RIBEIRO, A. Interactions between DNA and synthetic cationic liposomes. *The Journal of Physical Chemistry B*, v.104, p.2829-2835, 2000.

- KIKUCHI, I. S.; TAKAMOTO, R. T. O.; MATUO, M. C. S.; PINTO, T.J.A. Liposomes prepared from bixin as amphotericin B delivery system. In: 39TH ANNUAL MEETING & EXPOSITION OF THE CONTROLLED RELEASE SOCIETY, Québec, 2012. Disponível em:
- http://www.controlledreleasesociety.org/meetings/Documents/2012Abstracts/10 0532.pdf
- LASIC, D.D.; PAPAHADJOPOULOS, D. Liposomes revisited. *Science*. v.267, p.1275-1276, 1995.
- LEVY, L.W., RIVADENEIRA, D.M. Annatto. In: LAURO, G.B.; FRANCIS F.J. Natural Food Colorants: Science and Technology. Boca Raton: CRC Press, 2000. Cap. 6, p.117-152.
- LIDE, D. R. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 76 th ed. Boca Raton, Florida, CRC Press Inc. p 3-142, 1995.
- LI, H., ZHANG, S., WANG, B., CUI, S., YAN, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, v.114, p.100–109, 2006.
- MCKEOWN, G.G.; MARK, E. The composition of oil-soluble annatto food colors. *Journal of Association of Analytical Chemistry*, v. 45, p.761–766, 1962.
- MCKEOWN GG. Composition of oil-soluble food colours. II. Thermal degradation of bixin. *Journal of Association of Analytical Chemistry*, v. 46, p.790-796, 1963
- MERCK Index. 13^aed. Whitehouse Station, Merck Research Laboratories, Division of Merck & Co., 2001, 1741p.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022. Brasília: Ministério da Saúde, 2011

- MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A C.; MURRAY, J. C. Long-circulating and targetspecific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacological Reviews*, v.53, p.283-318, 2001.
- MONTENEGRO, M. A.; RIOS, A. D. O.; MERCADANTE, A. Z., NAZARENO, M. A.; BORSARELLI, C. D. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.367–373, 2004.
- NAJAR, S. V.; BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Effects of light, air, anti-oxidants and pro-oxidants on annatto extracts (*Bixa orellana*). *Food Chemistry*, v. 29, n. 4, p. 283-289, 1988.
- O'NEIL, M.J., (Ed.). The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 14^a Edição, 2006
- Pea F, Russo D, Michieli M et al. Liposomal daunorubicin plasmatic and renal disposition in patients with acute leukemia. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 46, p.279-286, 2000.
- PEPPAS, N. A.; CARR, D.A. Impact of absorption and transport on intelligent therapeutics and nanoscale delivery of protein therapeutic agents. *Chemical Engineering Science*, v.64, p.4553-4565, 2009.
- PAUMGARTEN, F.J.R.; DE-CARVALHO, R.R.; ARAUJO, I.B.; PINTO, F.M.; BORGES, O.O.; SOUZA, C.A.M.; KURIYAMA, S.N. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, v.40, p.1595-1601, 2002.
- PINTO, T.J.A.; KIKUCHI, I.S.; KANEKO, T.M.; MATUO, M.C.S.; TAKAMOTO, R.T.O. Vesículas lipídicas de carotenoides, composição, processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenoides e uso de vesículas lipídicas de carotenoides. BR n. PI.0.903.009-3, 31 ago. 2009. Revista de Propriedade Industrial, Rio de Janeiro, n.2032, p.88, 2009.
- RAHMAN, A.; WHITE, G.; MORE, N.; SCHEIN, P.S. Pharmacological, toxicological, and therapeutic evaluation in mice of doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes. *Cancer Research*, v.45, p.796-903, 1985.
- REITH, J. F.; GIELEN, J.W. Properties of Bixin and Norbixin and the Composition of Annatto Extracts. *Journal of Food Science*, v. 36, p. 861-864, 1971.

- RIOS, A.O.; 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. *Alimentos e Nutrição*, v.15, n.3, p.203-213, 2004.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. Carotenóides e provitaminas A. In: CARVALHO, P. R. N. (coordenador técnico) CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS -RESUMOS, Campinas, ITAL, p. 27-34, 1989.
- ROWINSKY, E.K. Clinical pharmacology of Taxol. Journal of the National Cancer Institute Monographs, v.15, p.25-37, 1993.
- SABÍN, J.; PRIETO, G.; RUSO, J. M.; HIDALGO-ALVAREZ, R.; SARMIENTO,
 F. Size and stability of liposomes: a possible role of hydration and osmotic forces. *The European Physical Journal. E, Soft Matter*, v.20, 401–408, 2006.
- SUBRA, A. K.; NISSEN, M. S.; LEWIS, K. M.; MURALIDHARAN, A. K.; SANCHEZ, E. J.; MILTING, H.; KANG, C. Molecular mechanisms of pharmaceutical drug binding into calsequestrin. *International Journal of Molecular Sciences*, v.13, n.11, p.14326-14343, 2012.
- SEINFELD AND PANDIS, Atmospheric Chemistry and Physics, 2^a Edição, John Wiley and Sons, New Jersey, 2006.
- SCOTTER, M. J. Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Food Additives and Contaminants*, v. 11, p. 301-315, 1994.
- SCOTTER, M.J. The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, v.26, p.1123–1145, 2009
- SOCACIU, C.; LAUSCH C.; DIEHL, H.A. Carotenoids in DPPC vesicles: membrane dynamics. *Spectrochimica Acta Part A*, v.55, p.2289-2297, 1999.
- TAKAMOTO, R. T. O.; MATUO, M. C. S.; KIKUCHI, I. S. Novos lipossomos de bixina como carreador de fármacos antineoplásicos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, Ribeirão Preto, 2012. Resumos. São Paulo, USP/Pró-Reitoria de Pesquisa, 2012. Res.1573 Disponível em:https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?num eroInscricaoTrabalho=1573&numeroEdicao=20

- THAN HTUN, M. Photophysical study on daunorubicin by fluorescence spectroscopy. *Journal of Luminescence*, v.129, p.344-348, 2009.
- TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.4, p.145-160, 2005.
- VERDONCK LF, LOKHORST HM, ROOVERS DJ, VAN HEUGTEN HG. Multidrug-resistant acute leukemia cells are responsive to prolonged exposure of daunorubicin: implications for liposome-encapsulated daunorubicin. *Leukemia Research*,v.22, p.249-256, 1998
- VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Method*, v.184, p.39-51, 1995.
- VERWEY, E. J. W.; OVERBEEK, J. T. G. Theory of the stability of lyophobic colloids. 1ed. Amsterdam:Elsevier, 1948.
- WIENS, T.; REDELMEIER, T.; AV-GAY, Y. Development of a liposome formulation of ethambutol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.48, p.1887-1888, 2004.
- ZHANG, X.; ZHAO, W.; HU, L.; ZHAO, L.; HUANG, J. Carotenoids inhibit proliferation and regulate expression of peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPARγ) in K562 cancer cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.512, p.96-106, 2011.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (2001). Some physicochemical properties of carotenoids. In D. B. Rodriguez-Amaya (Ed.), A guide to carotenoid analysis in foods (pp. 14e22). Washington: ILSI.
- BARBOSA-FILHO, J. M. *Bixa orellana*: Retrospectiva de usos populares, atividades biológicas, fitoquímica e emprego na fitocosmética, no continente americano, Simpósio Brasileiro do Urucum—SIMBRAU, João Pessoa, Brazil, 2006.
- ZECHMEISTER, L.; ESCUE, R. A stereochemical study of methylbixin. *Journal* of the American Chemical Society, v. 66, n.3, 1944.

ANEXOS

ANEXO 1

Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense) Lat. Am. J. Pharm. 34 (4): 740-7 (2015)

Regular article Received: December 4, 2014 Revised version: February 23, 2015 Accepted: February 24, 2015

Antimicrobial Activity of Novel Anionic Nanodispersion Prepared from Bixin.

Irene S. KIKUCHI*, Rafael T.O. TAKAMOTO, Míriam C.S. MATUO & Terezinha J.A. PINTO

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 58005508-900 São Paulo, SP, Brazil

SUMMARY. Annatto plant extracts have long been used for food colorants and medicinal purposes. Bixin and norbixin are the two main compounds isolated from *Bixa orellana* seeds surface and were evaluated as antimicrobial by themselves as well as drug carrier. Norbixin is the water soluble compound and demonstrated efficacy as antimicrobial when interacted with *Staphylococcus aureus*. Bixin is a non aqueous soluble compound and this study aimed to demonstrate it as nanodispersion former and effective against microorganisms. Bixin produced anionic spheric structures with antimicrobial activity against Gram positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). Bixin was also evaluated as drug carrier using Amphotericin B as model to be incorporated into nanodispersions. This novel preparation was also compared with commercial products demonstrating its capacity as drug carrier with practically no toxic effect on eukaryotic cells.

RESUMEN. Extractos de Bixa orellana han sido utilizados para colorantes alimentarios y con fines medicinales. La bixina y norbixina son los dos principales compuestos aislados de la superficie de semillas de *Bixa orellana* y se evaluaron como antimicrobiano, así como transportadores de fármacos. Norbixina es soluble en agua y posee demostrada eficacia como antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus*. La bixina es un compuesto insoluble en agua y este estudio tuvo como objetivo demostrar que una nanodispersión es eficaz contra los microorganismos. Bixina produce estructuras esféricas aniónicas con actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa*). Bixina también se evaluó como vehículo de fármacos usando anfotericina B como modelo para ser incorporado en nanodispersión nes. Esta novedosa preparación también se comparó con los productos comerciales, demostrando su capacidad como soporte del fármaco con prácticamente ningún efecto tóxico en las células eucariotas.

INTRODUCTION

Several countries have already prohibited the use of a number of synthetic food colorants due to their hazard and then natural colorants are gaining significance ¹. Most of the edible natural colorants are either water soluble or lipid soluble. Betacyanins in beetroot, sugar beet, anthocyanins in numerous fruits such as cherry, strawberry, cranberry, grape and blueberry are highly water soluble. Other colorants such as lycopene in tomato, bixin in annatto seeds, β -carotene in carrot and chlorophyll in green produce are only soluble in nonaqueous medium ¹.

Bixin and norbixin (Fig. 1) are the major

compounds isolated from *Bixa orellana* seeds surface and the term "annatto" refers to a serie of preparations containing these two carotenoidtype pigments. Annatto is considered essentially nontoxic and in the United States, it is classified as a natural colorant for certification ².

In some countries, annatto has long been used for medicinal purposes such as the treatment of diabetes ³, skin infections, etc. Annatto plant extracts have demonstrated some specific activities, for example, an inhibitory effect against *Neisseria gonorrboea* ⁴, a significant antimicrobial activity against standard strains of gram-positive bacteria including *Baccillus sub*-

KEY WORDS: amphotericin B, annatto, antimicrobial, bixin, drug carrier, nanodispersion.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: isatiko@usp.br

ISSN 0326 2383 (printed ed.) ISSN 2362-3853 (on line ed.)

ANEXO 2



Universidade de São Paulo Simpósio Internacional de Iniciação Científica e-mail.:siicusp@usp.br

ANEXO 3

