

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
CAMPUS GAMA – FGA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO CELULAR
DE EXTRATO BRUTO DE SEMENTE DE *BIXA ORELLANA L.***

CAROLINA RAMOS DOS SANTOS

ORIENTADORA: DRA. MARCELLA LEMOS BRETTAS CARNEIRO



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
FACULDADE UNB GAMA – FGA



**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO
CELULAR DE EXTRATO BRUTO DE SEMENTE DE *BIXA ORELLANA L.***

CAROLINA RAMOS DOS SANTOS

ORIENTADORA: MARCELLA LEMOS BRETTAS CARNEIRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM
ENGENHARIA BIOMÉDICA

PUBLICAÇÃO: 168A/2023
BRASÍLIA/DF, JULHO DE 2023

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
FACULDADE UNB GAMA – FGA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO
CELULAR DE EXTRATO BRUTO DE SEMENTE DE *BIXA ORELLANA L.***

CAROLINA RAMOS DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

APROVADA POR:

MARCELLA LEMOS BRETTAS CARNEIRO
(ORIENTADORA)

DR. JAIR TRAPÉ GOULART
(EXAMINADOR INTERNO)

DR. MARCUS VINICIUS LIA FOOK
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, JULHO DE 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

SANTOS, CAROLINA RAMOS DOS

Extração, caracterização e avaliação do potencial de regeneração celular de extrato bruto de semente de *Bixa orellana L.*

[Distrito Federal], 2023.

71p., 210 x 297 mm (FGA/UnB Gama, Mestrado em Engenharia Biomédica, 2023).

Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Faculdade UnB Gama, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

- | | |
|--------------------------------|----------------------------|
| 1. Extrato de urucum | 2. <i>Bixa orellana L.</i> |
| 3. Regeneração celular | 4. Métodos de extração |
| I. Carneiro, Marcella, orient. | II. Título. |

REFERÊNCIA

SANTOS, Carolina Ramos dos (2023). Extração, caracterização e avaliação do potencial de regeneração celular de extrato bruto de semente de *Bixa orellana L.* Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Publicação 168A/2023, Programa de Pós-Graduação, Faculdade UnB do Gama, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 71p.

CESSÃO DE DIREITOS

Autor: Carolina Ramos dos Santos

Título: Extração, caracterização e avaliação do potencial de regeneração celular de extrato bruto de semente de *Bixa orellana L.*

Grau: Mestre

Ano: 2023

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender essas cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Carolina Ramos dos Santos

210006757@aluno.unb.br

Brasília, DF – Brasil

RESUMO

Úlcera de Pé Diabético (UPD) representa um elevado fator de risco para amputação e está entre as principais causas de hospitalização em diabéticos, culminando em alto custo para o Sistema Único de Saúde (SUS). Assim, esta moléstia representa um grave problema de saúde público, suscitando a necessidade de investimento público para o desenvolvimento de pesquisas voltadas para a busca de estratégias terapêuticas curativas. Nosso grupo desenvolveu um sistema terapêutico para neoformação tecidual o qual foi denominado Rapha® plus, que consiste no uso concomitante de fototerapia e curativo baseado em biomembrana de látex natural (BLN), oriundo de *Hevea brasiliensis*, contendo lipossomas com curcumina (*Curcuma longa*). Os resultados foram muito promissores, visto que a cicatrização com este sistema foi cerca de 70% superior à do tratamento convencional adotado como padrão-ouro pelo SUS. Todavia, este curativo não apresentou efeito antimicrobiano. Por isso, a associação de bioativos com atividade antimicrobiana poderia ser útil e favorecer um efeito sinérgico na promoção da cicatrização, dado que infecções bacterianas estão relacionadas com o agravamento da ferida e o aumento das chances de amputações. Neste trabalho, propõe-se a extração, caracterização e avaliação da biocompatibilidade, potencial antioxidante e para regeneração celular do extrato de semente de urucum (*Bixa orellana*). Extrato de urucum apresenta bioativos com propriedades antioxidante e antimicrobiana. Neste estudo, será utilizado extrato bruto de sementes de urucum (*Bixa orellana L.*), obtidos de forma comercial por meio de doação pela empresa New Max® ou por meio de extração química por solvente. As sementes de urucum foram obtidas de comunidade extrativista quilombola. A extração dos compostos das sementes, por meio de solvente, foi realizada com os solventes de Hexano, Acetato de Etila e Etanol nas temperaturas de 50°C e 130°C para definição do protocolo de extração mais eficiente. Para avaliação da composição química do extrato e validação do método de extração, realizaram-se análises por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Espectrofotometria. Com base nos resultados, os métodos de extração de biocompostos de interesse, como os carotenoides bixina e norbixina, foram eficientes. O extrato de urucum obtido por meio da extração com etanol a 50°C apresentou o maior rendimento (7,69 g) e teor de extrato (57,5%), dado que o tempo de retenção de bixina foi mais próximo ao padrão comercial deste biocomposto. Por isso, esse extrato foi utilizado para realização das análises de biocompatibilidade *in vitro* de queratinócitos e fibroblastos, por meio dos ensaios de brometo

de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e de regeneração celular por meio de “*Scratch assay*”. Além disso, avaliou-se o potencial antioxidante do extrato. Foram testadas doses de 2,5 a 80 µg/mL e observou-se viabilidade celular acima de 80%, exceto na dose de 80 µg/mL. Com isso, foi selecionada a dose de 10 µg/mL para realização do ensaio de migração celular. Para avaliação da atividade antioxidante do extrato, utilizou-se uma técnica de ressonância magnética eletrônica, mas não foi possível detectar atividade antioxidante na dose de 1 mg/mL. Também foi realizado outro método para avaliação de sequestro de radicais livres (DPPH) e notou-se cerca de 50% de atividade antioxidante em comparação com o controle (ácido ascórbico) após 30 minutos de exposição a 10 e 100 µg/ml de extrato. Concluiu-se que o método de extração de biocompostos do extrato de urucum utilizando-se o solvente etanol a 50°C foi o método com maior rendimento. Além disso, pôde-se concluir que o extrato obtido por esse método é biocompatível nas doses de até 80 µg/ml e que apresenta significativa atividade antioxidante e potencial para regeneração tecidual. Portanto, o extrato de urucum apresenta elevado potencial para associação a curativos, dado que a propriedade antioxidante é muito útil para o processo de cicatrização.

Palavras-chave: extrato de urucum, *Bixa orellana L.*, regeneração celular, métodos de extração.

ABSTRACT

Diabetic Foot Ulcer (DFU) represents a high-risk factor for amputation and is among the leading causes of hospitalization in diabetics, culminating in an excessive cost to the Unified Health System (SUS). Thus, this disease represents a serious public health problem, raising the need for public investment in the development of research aimed at finding curative therapeutic strategies. Our group has developed a therapeutic system for tissue neoformation named Rapha® Plus. It consists of the concomitant use of phototherapy and a dressing based on natural latex biomembrane (BLN) from *Hevea brasiliensis*, containing liposomes with curcumin (*Curcuma longa*). The results were very promising since the healing with this system was about 70% higher than the conventional treatment adopted as the gold standard by SUS. However, this dressing did not show an antimicrobial effect. Therefore, the association of bioactives with antimicrobial activity could be useful and favor a synergistic effect in the promotion of healing since bacterial infections are related to wound worsening and increased chances of amputations. In this work, we propose the extraction, characterization, and evaluation of the biocompatibility and antioxidant potential for cell regeneration of annatto seed extract (*Bixa Orellana L.*). The annatto extract has bioactives with antioxidant and antimicrobial properties. In this study, the crude extract of annatto (*Bixa orellana L.*) seeds, obtained commercially through donation by the New Max® company or through chemical solvent extraction, will be used. The annatto seeds were obtained from an extractive *quilombola* community. The solvent extraction of the compounds from the seeds was performed with the solvents Hexane, Ethyl Acetate, and Ethanol at temperatures of 50°C and 130°C to define the most efficient extraction protocol. For the evaluation of the chemical composition of the extract and validation of the extraction method, analyses were performed using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Spectrophotometry. Based on the results, the extraction methods for biocompounds of interest, such as the carotenoids bixin and norbixin, were efficient. The annatto extract, obtained by extraction with ethanol at 50°C, showed the highest yield (7.69 g) and extract content (57.5%), since the retention time of bixin was closest to the commercial standard of this biocompound. Therefore, this extract was used to perform the in vitro biocompatibility analyses of keratinocytes and fibroblasts, by means of MTT assays, and cell regeneration by means of the "Scratch assay". Additionally, the antioxidant potential of the extract was evaluated. Doses from 2.5 to 80 µg/mL were tested, and cell viability above 80%

was observed, except at the 80 µg/mL dose. Thus, the dose of 10 µg/mL was selected to perform the cell migration assay. To evaluate the antioxidant activity of the extract, an electron magnetic resonance technique was used, but it was not possible to detect antioxidant activity at the dose of 1 mg/mL. Another method was also performed to evaluate free radical scavenging (DPPH), and about 50% of antioxidant activity compared to the control (ascorbic acid) was observed after 30 minutes of exposure to 10 and 100 µg/mL of extract. It was concluded that the method of extraction of biocompounds from annatto extract using the solvent ethanol at 50°C was the method with the highest yield. Moreover, it could be concluded that the extract, obtained by this method, is biocompatible and doses of up to 80 µg/mL and that it presents significant antioxidant activity and potential for tissue regeneration. Therefore, the annatto extract presents high potential for association with curatives, given that the antioxidant properties are particularly useful for the healing process.

Keywords: extract of annatto, *Bixa orellana L.*, cell regeneration, extraction methods.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos que participaram desta jornada comigo, sendo de perto ou de longe. Em primeiro lugar, à minha família em que me apoiou mudar de estado e seguir com os estudos, sempre incentivando positivamente, e em especial, ao meu esposo Ítalo. Foi ele quem me apresentou Brasília, me guiou em um lugar novo, me acolheu e sempre com muito amor e carinho.

Agradeço à minha orientadora, professora e doutora Marcella Carneiro, que no primeiro contato com o programa de mestrado, me acolheu, me incentivou, me convidou a orientar e hoje, graças ao seu acolhimento e confiança, concluo esta etapa, de maneira leve e feliz.

Ao grupo do Laboratório de Compostos Bioativos e Nanotecnologia – LCBNano, um grupo de pesquisa com pessoas humanas, que me ensinou muito nestes anos e me permitiu amizades para a vida, fazendo com que o caminho na pós-graduação fosse tranquilo.

A todos os professores da banca, que foram meus professores de matérias no curso e permitiram a minha formação hoje, com contribuições riquíssimas, sempre incentivando mais a realização de pesquisas.

A todos os professores que permitiram minha formação durante este período, aos secretários Denise e Anderson, sempre atenciosos e preocupados com nosso bem-estar, e a coordenadora do curso de Engenharia Biomédica, professora Marília, que sempre apoiou cada aluno para que seguisse de maneira a concluir o curso.

A todos os técnicos de laboratório do campus Darcy Ribeiro e de Planaltina, sempre dispostos a ajudar nos processos experimentais. Também à Doutora Laís Morais, que contribuiu grandemente para a parte experimental do projeto.

Aos meus colegas de curso e principalmente, aos meus colegas do coração, Ana, Maysa, Matheus, Jhon e Lucas, do MCJAML, que mesmo todos longe, continuam apoiando em nossas escolhas. A minha grande amiga Ana Karoline, minha primeira amizade no curso a qual levarei para a vida e para sempre. Agradecimento em especial a minha sogra Geneci, que se tornou uma grande amiga, incentivando, apoiando e me acolhendo.

Agradeço ao programa de pós-graduação em Engenharia Biomédica, a Universidade de Brasília. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral.....	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
3.1	Complicações da diabetes e úlcera de pé diabético	22
3.1.1	Tratamentos convencionalmente empregados para UPD	24
3.1.2	Sistema terapêutico de neoformação tecidual – Rapha®	26
3.2	Regeneração celular	28
3.3	Urucum (Bixa orellana L.)	29
3.3.1	Urucum e a Bioeconomia	32
3.3.2	Extração de biocompostos do urucum.....	33
3.3.3	Caracterização de biocompostos do urucum	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Obtenção das sementes e corantes de Bixa orellana L.....	38
4.2	Extração de biocompostos de sementes de urucum	39
4.3	Caracterização de biocompostos de Bixa orellana L.	42
4.3.1	Análise de teor de bixina e norbixina por meio de espectrofotometria	42
4.3.2	Análise de teor de bixina e norbixina por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	43
4.4	Avaliação do potencial antioxidante do extrato	44
4.4.1	Ressonância paramagnética eletrônica	44
4.4.2	Avaliação do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre (DPPH)	46
4.5	Ensaio in vitro.....	48
4.5.1	Cultivo de células	48
4.5.2	Tratamento das células com extrato de urucum.....	49
4.5.3	Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT.....	51
4.5.4	Análise de potencial de regeneração in vitro: ensaio de migração celular	51
4.6	Análise estatística	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	Rendimento dos extratos de sementes de urucum.....	54
5.2	Caracterização dos extratos e corantes de urucum.....	55
5.2.1	Avaliação do rendimento dos extratos e corantes de urucum	55
5.2.2	Porcentagem do teor de bixina e norbixina nas amostras.....	57
5.2.3	Análise da composição das amostras de urucum por CLAE	60

5.3	Viabilidade celular	63
5.4	Migração celular.....	66
5.5	Atividade potencial antioxidante.....	68
6	CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
	LISTA DE REFERÊNCIAS.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento das amostras obtidas a partir da extração de biocompostos de sementes de urucum.....	55
Tabela 2. Valores de absorbância dos extratos de semente de urucum e de corante natural de urucum da New Max.....	57
Tabela 3. Valores de tempo de retenção, área, porcentagem da área e altura dos picos dos cromatogramas por análise CLAE das amostras de sementes de urucum. Valores de tempo de retenção, área, porcentagem da área e altura dos picos dos cromatogramas por análise CLAE das amostras de sementes de urucum.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Resumo dos cuidados e objetivos das ações para o tratamento das úlceras de pé diabético. Fonte: Manual do Pé diabético do Ministério da Saúde, BRASIL, 2016, [17] com adaptações.....	25
Quadro 2. Identificação das amostras de extrato de urucum de acordo com o solvente e temperatura utilizados.....	40
Quadro 3. Equações de cálculo de rendimento de extrato bruto, porcentagem de bixina e norbixina e cálculo de diluição das amostras de extrato de urucum.....	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1.** Processo de inflamação de ferimento diabético agravado pela hiperglicemia. Reproduzido de “Skin with Injury” (Pele com ferimentos), por BioRender.com (2022). 24
- Figura 3.2.** Curativo baseado em biomembrana de látex natural e equipamento móvel, componentes do Kit Rapha. Foto: Beatriz Ferraz/Secom UnB. Fonte: <https://unbciencia.unb.br/exatas/68-engenharia-eletronica/539-projeto-rapha-acelera-cura-para-o-pe-diabetico>, acessado em 23 de dezembro de 2022. 27
- Figura 3.3.** Número de publicações por ano do termo “annatto” na base de dados PubMed. Busca realizada no dia 28 de junho de 2023. 31
- Figura 3.4.** Análise bibliométrica do termo “annatto” na base de dados PubMed. Busca realizada no dia 28 de junho de 2023. Utilizado o *software* VOSViewer. 32
- Figura 3.5.** Estrutura química da (a) trans- e (b) cis-bixina (para $R = CH_3$) ou norbixina (para $R = H$) [54]. 34
- Figura 4.1.** Resumo das etapas experimentais realizadas neste trabalho. Etapa 1: obtenção das amostras de urucum; etapa 2: extração de biocompostos das sementes; caracterização dos compostos dos extratos de *Bixa orellana* por espectrofotometria e cromatografia. 37
- Figura 4.2.** Planta nativa (*Bixa orellana*) onde foram colhidas as sementes de urucum para os ensaios de extração e caracterização. 38
- Figura 4.3.** Equipamento de Extração Acelerada por Solvente – 150, utilizado para extração por solvente das sementes de urucum (ASE -150 - do inglês *Accelerator Solvent Extractor*)... 39
- Figura 4.4.** Etapas e equipamento utilizado na extração de biocompostos de urucum. A) Extrator por solvente acelerado, B) Rotaevaporador, C) Transferência do extrato do balão volumétrico para o frasco de vidro identificado e D) Liofilizador. 41
- Figura 4.5.** Amostras de extrato de urucum diluída em dimetilsulfóxido de Etanol extraído por ASE a 130°C(A) e Etanol a 50°C (B), alocadas em placas de 24 poços e (C) seringas com amostras de extrato de urucum congeladas no nitrogênio líquido (D). 46
- Figura 4.6.** Esquema de alocação das amostras de Extrato de Urucum, Ácido Ascórbico, Metanol (Banco) e Solução de DPPH (Controle). 47
- Figura 4.7.** Representação dos procedimentos adotados no ensaio de potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH. Placa de 96 poços com as demarcações (A), método para manter no escuro (B), solução de DPPH diluído em metanol (C) e leitura em espectrofotômetro (D). 48
- Figura 4.8.** Simulação de migração celular após uma ranhura em células aderidas, onde em A apresenta o tempo 0 hora após a ranhura e o B representa após 24 horas da ranhura. Imagem criada pelo aplicativo BioRender. 52
- Figura 5.1.** Análise de teor de bixina em amostras de sementes de urucum obtidas por extração com solvente e amostras de corantes de urucum. A análise foi realizada em espectrofotômetro e, com base na absorbância, foi calculada a porcentagem de teores de bixina em extratos e corantes de urucum. Extratos por solventes Hexano a 50°C (H50), Hexano a 130°C (H130), Acetato de Etila a 50°C (AC50), Acetato de Etila a 130°C (AC130), Etanol a 50°C (E50), Etanol a 130°C (E130), suspensão oleosa-bixina (SO BIX), corante natural de urucum-norbixina (NRBX) e corante de extrato bruto de urucum (EB). 59
- Figura 5.2.** Análise de teor de norbixina em amostras de sementes de urucum obtidas por extração com solvente e amostras de corantes de urucum. A análise foi realizada em espectrofotômetro e, com base na absorbância, foi calculada a porcentagem de teores e norbixina em extratos e corantes de urucum. Extratos por solventes Hexano a 50°C (H50),

Hexano a 130°C (H130), Acetato de Etila a 50°C (AC50), Acetato de Etila a 130°C (AC130), Etanol a 50°C (E50), Etanol a 130°C (E130), suspensão oleosa-bixina (SO BIX), corante natural de urucum- norbixina (NRBX) e corante de extrato bruto de urucum (EB).	59
Figura 5.3. Picos dos cromatogramas da análise CLAE das amostras de semente de urucum. Extratos obtidos com uso de solventes Etanol a 50°C (E 50), Etanol a 130°C (E 130), Acetato de Etila a 50°C (AE 50), Acetato de Etila a 130°C (AE 130), Hexano a 50°C (H 50), Hexano a 130°C (H 130),.....	61
Figura 5.4. Picos dos cromatogramas da análise CLAE do padrão Bixina (Sigma > 95% de pureza).....	62
Figura 5.5. Valores da porcentagem da área do pico após a leitura das amostras no CLAE. Valores da porcentagem da área do pico após a leitura das amostras no CLAE. Extratos por solventes Hexano a 50°C (H50), Hexano a 130°C (H130), Acetato de Etila a 50°C (AC50), Acetato de Etila a 130°C (AC130), Etanol a 50°C (E50), Etanol a 130°C (E130), Padrão sigma > 95%	63
Figura 5.6. Viabilidade celular de queratinócitos (linhagem HaCat) após tratamento com extrato de urucum diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) ou etanol (ETOH), nas concentrações indicadas, por 24, 48 e 72 h. Os dados representam a Média ± Desvio Padrão. Foi realizado a ANOVA e teste Tukey ($p < 0,05$).....	65
Figura 5.7. Viabilidade celular de fibroblastos após tratamento com extrato de urucum diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) ou etanol (ETOH) por 24, 48 e 72 h. Os dados representam a Média ± Erro Padrão. Foi realizado a ANOVA e teste Tukey ($p < 0,05$).....	66
Figura 5.8. Ensaio de migração celular de fibroblastos após tratamento de somente cultura de célula, controle de células com DMSO (dimetilsulfóxido) 1% e com extrato de urucum por 24, 48 e 72 h. Os dados representam a Média ± Erro Padrão.	67
Figura 5.9. Imagens representativas de células Fibroblastos em um ensaio de ranhura. As imagens foram tiradas imediatamente após os arranhões e depois de 24, 48 e 72 horas.....	68
Figura 5.10. Análise quantitativa de ERO (espécies reativas de oxigênio) realizada através da medição da concentração de CM• (3-metoxycarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxil) em amostras de extrato de urucum diluída em etanol (ETOH), suspensão oleosa de bixina (Susp. Ol.) e DMSO. Dados representados como média ± erro padrão da média. Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Tukey foi utilizado para comparar os três grupos em cada momento do tratamento.	69
Figura 5.11. Análise da porcentagem de atividade antioxidante de amostras de extrato de urucum diluída em etanol DMSO. Dados representados como média ± erro padrão da média. Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Tukey foi utilizado para comparar os dois grupos em cada momento do tratamento.	70

LISTA DE NOMENCLATURAS E ABREVIações

3DCRT	Radioterapia Conformacional 3D, do inglês <i>3D Conformal Radiotherapy</i>
AAPM	Associação Americana de Física na Medicina, do inglês <i>American Association of Physics in Medicine</i>
ASE	Extrator por Solvente Acelerado
BLN	Biomembrana de látex natural
CCT	Centro de Ciências e Tecnologia
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)
CMH	1-hidroxi-3-metoxycarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina
CQ	Controle de Qualidade
DF	Distrito Federal
DM	Diabetes de Mellitus
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DPPH	2,2 Difenil 1 picrilhidrazila
EB	Extrato bruto de urucum
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
HbA1c	Hemoglobina A1c
IDF	Federação Internacional de Diabetes – do inglês <i>International Diabetes Federation</i>
LCQUI	Laboratório de Ciências Químicas
LED	Diodo emissor de luz – do inglês <i>light-emitting diode</i>
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
ND	Nefropatia diabética
NRBX	Corante natural de urucum-norbixina
OGTT	Teste de tolerância à glicose oral
PBS	Solução tampão de fosfato-salina
RD	Retinopatia diabética
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SO BIX	Suspensão oleosa-bixina
SPT	Sistema de Planejamento de Tratamento
SUS	Sistema Único de Saúde
UENF	Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

UPD Úlcera de Pé Diabético

1 INTRODUÇÃO

A úlcera de pé diabético (UPD) é uma das complicações mais graves da diabetes e está associada a um alto risco de amputação e a uma redução da qualidade de vida, podendo levar a óbito. Trata-se de uma lesão complexa que pode estar associada a isquemia tecidual, neuropatia periférica e infecção [1].

A UPD geralmente está associada à angiogênese desregulada, resposta inflamatória crônica, níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (ERO) e colonização bacteriana persistente de difícil tratamento [2]. Destaca-se que essa enfermidade acometeu cerca de três milhões de pessoas no Brasil em 2021 e, ainda, não há soluções terapêuticas efetivas [3]. Assim, esta moléstia representa um grave problema de saúde público, suscitando a necessidade do desenvolvimento de pesquisas voltadas para a busca de estratégias terapêuticas curativas. O tratamento dessas úlceras requer uma abordagem interdisciplinar e sistemática que compreenda controle da glicemia, desbridamento cirúrgico, recanalização vascular, tratamento de descompressão e tratamento de suporte [4]. Além disso, os procedimentos reconstrutivos poupadores do pé ou de pequenas amputações tornam-se estratégias fundamentais para preservação dos membros [5].

Nosso grupo desenvolveu um sistema terapêutico chamado Rapha®, que utiliza uma biomembrana de látex natural (BLN) e fototerapia para tratar UPD. Esse sistema mostrou ser mais eficaz e de melhor custo-benefício que o tratamento padrão utilizado no Sistema Único de Saúde (SUS) [6]–[9]. Recentemente, o sistema Rapha® foi aprimorado por meio da adição de curcumina, um biocomposto com propriedade cicatrizante e anti-inflamatória, à BLN. Este sistema será denominado neste trabalho como Rapha® plus, que envolve o curativo de látex natural contendo curcumina (BioCur) e fototerapia. Ensaios clínicos preliminares demonstraram que o tratamento com o sistema Rapha® plus promoveu cicatrização superior ao tratamento convencional do SUS e do Rapha® convencional, embora não tenha mostrado efeito antimicrobiano [6].

Assim, a associação de bioativos com atividade antimicrobiana pode ser útil e favorecer um efeito sinérgico na promoção da cicatrização, dado que infecções bacterianas estão relacionadas com o agravamento da ferida e aumento das chances de amputações. Neste

trabalho, propõe-se a extração, caracterização e avaliação da biocompatibilidade e potencial antioxidante e para regeneração celular de extrato de semente de urucum.

O urucuzeiro (*Bixa Orellana L.*) é uma planta nativa da América do Sul e Central e suas sementes são ricas em carotenoides como bixina e norbixina. Estes compostos têm demonstrado favorecer o processo de cicatrização de feridas. Tais carotenoides são amplamente pesquisados por apresentarem ações antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes. [37]-[44].

Estudos *in vitro* com células da epiderme são fundamentais para entender o processo de cicatrização. Um ensaio de migração celular é uma técnica simples e econômica, que permite avaliar a taxa de migração de células aderentes, como queratinócitos e fibroblastos. Nesse ensaio, as células, que estão em contato umas com as outras, são cultivadas em uma superfície plana até formarem uma camada contínua. Em seguida, uma faixa de células é removida por raspagem mecânica da camada celular. Como resposta, a camada celular se espalha e as células migram para preencher a região vazia, fechando a “ferida” [11].

As UPDs são ferimentos crônicos e caracterizadas por uma perda progressiva das fibras nervosas periféricas causada pela diminuição do fluxo sanguíneo e pelo alto nível glicêmico [12], prolongando o processo de cicatrização da úlcera. À vista disto, estudos de migração celular possibilitam a compreensão das concentrações de dosagem de fármacos ou biomateriais a serem testados como potencializadores no processo de regeneração tecidual.

O estudo com modelos de linhagens celulares aderentes é de grande importância para esses aspectos. Inclusive, é consenso que fibroblastos estimulam a migração, proliferação, alinhamento e formação de tubos nas células endoteliais por meio da produção de fator de crescimento endotelial vascular e outros fatores de crescimento; interações cruciais para a angiogênese [13]. Os fibroblastos migram independentemente, enquanto queratinócitos e células endoteliais migram como uma folha contígua, padrões de migração *in vitro* que refletem o comportamento celular *in vivo*, validando os resultados. Estudos de migração em células 2D têm sido realizados para modelos de feridas em UPD, tais como estudos de eventos de nitração de proteínas em fibroblastos sob condições diabéticas [14].

Ainda, compostos de origem vegetal possuem diversas propriedades medicinais devido às atividades biológicas anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas. A obtenção destes compostos bioativos pode ser realizada por meio da extração de biocompostos de folhas,

sementes, caule ou raízes das plantas [15] e são bastante utilizados na formulação de medicamentos com poucas ou nenhuma contraindicação [16].

Neste estudo, realizou-se a obtenção, extração e caracterização de compostos bioativos da semente de *Bixa orellana L.* bem como a avaliação do potencial antioxidante e terapêutico na regeneração *in vitro* de queratinócitos e fibroblastos, por meio de ensaios de biocompatibilidade, migração celular e atividade antioxidante. Tem-se por hipótese que o extrato de sementes de urucum possui potencial terapêutico devido ao seu efeito antioxidante e capacidade pró-regenerativa. Essa substância poderia ser associada ao BioCur no sistema *Rapha® plus* para o tratamento de UPD.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a extração e caracterização de biocompostos de extrato de sementes de urucum e avaliar a biocompatibilidade e potencial antioxidante e regenerativo *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter extrato bruto de urucum de sementes de *Bixa orellana L*;
2. Definir um método ideal de extração de biocompostos de urucum, por meio de extração química usando diferentes solventes e temperaturas;
3. Caracterizar a composição química dos extratos e quantificar os biocompostos obtidos, por meio de análises cromatográficas e espectrofotométricas;
4. Avaliar a biocompatibilidade, atividade antioxidante e potencial de extrato de urucum na promoção da regeneração celular de queratinócitos e fibroblastos, por meio de análises de viabilidade, migração celular e de produção de radicais livres;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 COMPLICAÇÕES DA DIABETES E ÚLCERA DE PÉ DIABÉTICO

Uma das complicações mais graves decorrentes da diabetes é a UPD. Por exemplo, de acordo com os dados do Ministério da Saúde, em 2016, 20% das internações de pacientes com Diabetes de Mellitus (DM) foram decorrentes de lesões nos membros inferiores e 85% das amputações destes membros tiveram como procedência ulcerações [17].

No Brasil, existem mais de 12 milhões de diabéticos, sendo que 25%, ou seja, três milhões, desenvolvem úlceras nos membros inferiores. O custo com tratamento de UPD representa 85% de todos os gastos ambulatoriais com diabetes por ano e isso representa cerca de 498 milhões de reais atualmente [3]. A UPD é uma das principais causas de morbidade de alto custo no mundo, onde a falta dos devidos cuidados com as úlceras pode levar à hospitalização, amputação e morte, o que torna a UPD um problema de saúde pública global [18].

A UPD é caracterizada pela presença de úlcera, de inflamação local e de lesão cutânea profunda, apresentando irregularidades vasculares periféricas, além de estar associada à disfunção neurológica [19]. Ainda, a UPD pode ocasionar disfunção neuropática, na qual ocorre uma perda da sensibilidade vascular, também conhecida como isquêmica [17].

A manifestação da UPD se associa a vários fatores, como: alterações biomecânicas provocadas pela destruição osteoarticular; doença arterial periférica; e deformidades decorrentes da neuroartropatia de *Charcot*, responsável por alterar as pressões de apoio na planta do pé [9]. A neuropatia sistêmica é causada pela alta concentração de glicose no sangue, tendo como consequência o aparecimento de lesões nas fibras nervosas (neuropatia), o que ocasiona interferência nas funções autonômicas, motoras e sensoriais; favorecendo, assim, o surgimento de UPD [8].

Sabe-se que a hiperglicemia interrompe processos que são críticos para a síntese de proteínas, migração e proliferação de queratinócitos e fibroblastos e há evidências crescentes sugerindo que a hiperglicemia aguda desempenha um papel na patogênese das complicações diabéticas [2], [20]. Sabe-se, ainda, que a hiperglicemia também promove o aumento do estresse oxidativo, que parece afetar o suprimento sanguíneo e, conseqüentemente, a deterioração de todos os aspectos do sistema nervoso periférico, causando a neuropatia diabética [21].

Cada tipo de neuropatia (sensorial, motora e/ou autonômica) pode contribuir de forma única para o comprometimento da cicatrização de úlceras. Por exemplo, a neuropatia autonômica diminui a atividade das glândulas sudoríparas, deixando a pele seca e rachada, aumentando, assim, o risco de prurido e infecção, o que inibe a cicatrização de feridas [2], [21].

Além dessas complicações, o estresse oxidativo é um agente significativo no processo de inflamação e, conseqüentemente, de cicatrização. Ainda se destaca que o estresse oxidativo é um estado em que as espécies de oxigênio reativo (ERO), em excesso, sobrecarregam os sistemas antioxidantes endógenos. Isso resulta em efeitos funcionais distintos em cada tipo de célula que atuam em papéis fisiológicos e patofisiológicos [22].

Sabe-se que lesões cutâneas que não manifestam defeito fisiopatológico cicatrizam sem a necessidade de regeneração, enquanto feridas com anormalidades fisiopatológicas preexistentes, como a UPD, apresentam uma cicatrização prejudicada [23]. A hiperglicemia decorrente da diabetes contribui ainda para o desenvolvimento de complicações vasculares que podem induzir uma disfunção endotelial difusa e contribuir para o progressivo desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares nos membros inferiores [20].

Essas complicações dificultam a cicatrização da úlcera diabética, como apresentado na Figura 3.1. Outras causas, além da hiperglicemia, que podem levar a uma resposta inflamatória prolongada são as disfunções celulares e acumulação de produtos finais de glicação avançada [6]. Fatores internos, como complicações vasculares e neuropatia, e externos, como pressão provocada pelo paciente ao tentar andar e manutenção do curativo, são entraves que também prejudicam o processo de cicatrização da úlcera. Ainda, a elevação crônica da glicemia pode provocar danos teciduais acometendo o funcionamento pleno dos órgãos e, em alguns casos mais graves, levando ao óbito [24].

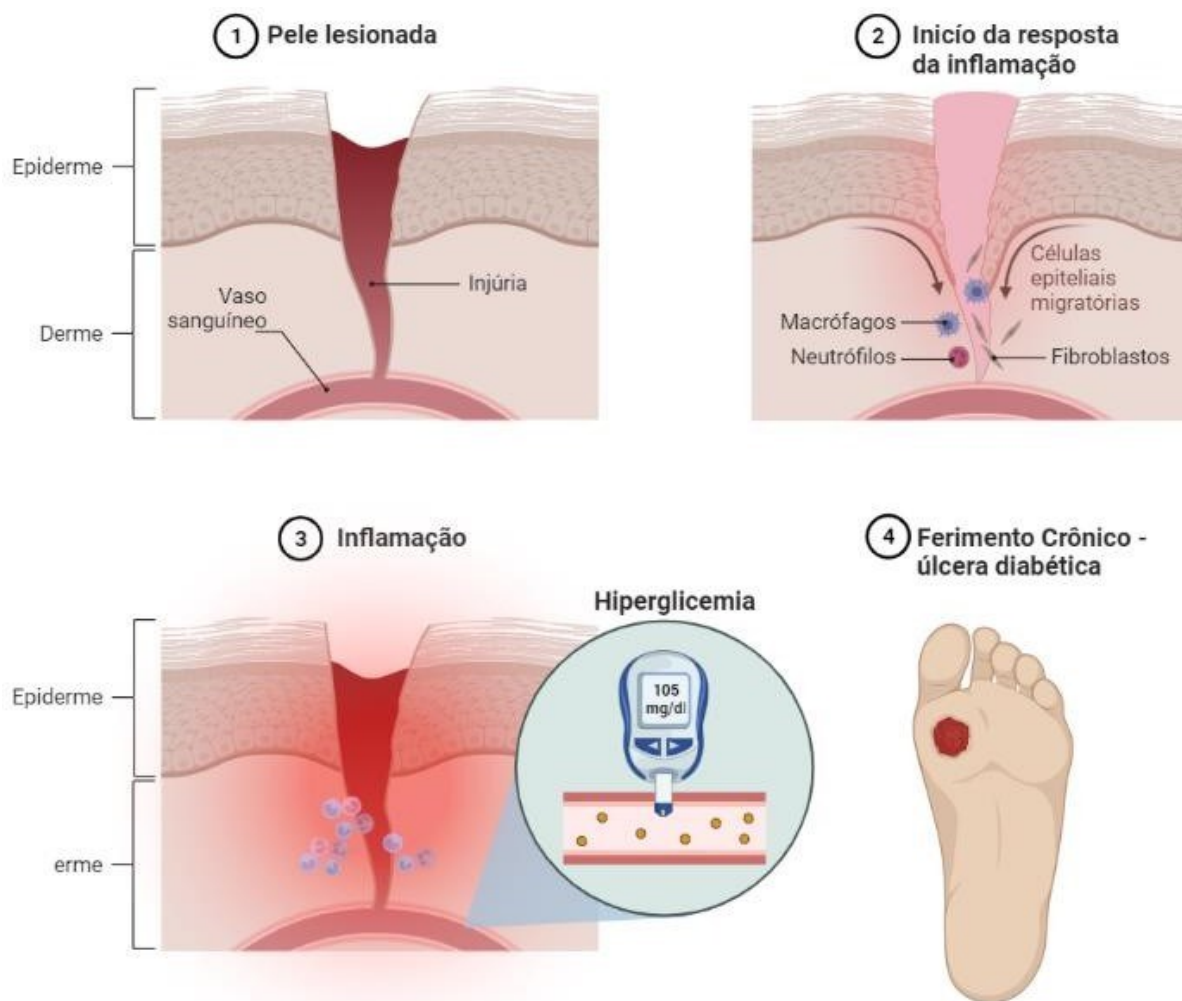


Figura 3.1. Processo de inflamação de ferimento diabético agravado pela hiperglicemia. Reproduzido de “*Skin with Injury*” (Pele com ferimentos), por BioRender.com (2022).

3.1.1 Tratamentos convencionalmente empregados para UPD

A UPD promove uma inflamação prolongada e isso está associado ao principal motivo de internação dos portadores de DM. Em decorrência disso, não há uma progressão ordenada de cicatrização, o que pode estagnar tal processo [23]. Segundo o Manual do Pé Diabético [17], a recomendação de autocuidado para os pacientes portadores de DM na prevenção de feridas inclui: realização de inspeção e higiene diária dos pés; cuidado com a temperatura da água; corte de unha reta; não usar sapatos ou meias apertadas; dentre outros.

Para o tratamento das UPD, existem protocolos específicos. O fato de a úlcera apresentar a barreira mecânica (cobertura com pele) obstruída ou ausente facilita o contato com agentes patológicos externos. O desbridamento ajuda a reduzir a carga bacteriana e aumenta a eficácia do sistema imunológico, uma vez que a formação descontrolada de biofilmes pode se tornar multirresistente e dificultar o processo de cicatrização [2].

Durante o monitoramento de UPD, feito por enfermeiros em ambulatório, avalia-se a presença de tecidos viáveis (granulação e epitelização) e inviáveis (necrose seca e úmida) [9]. Além disso, deve ser feita: a avaliação da indicação de antibioticoterapia sistêmica para tratamento de celulite ou infecção óssea; a otimização da distribuição da pressão; e o controle da glicemia [25]. É necessária a observação de cada caso para prosseguimento do tratamento mais próximo do ideal. Existem diversos materiais como pomadas e curativos para o tratamento das úlceras [17].

O objetivo de usar curativo no tratamento de UPD é favorecer o processo de cicatrização, mantendo a ferida limpa, úmida e coberta. O padrão-ouro SUS nas terapias tópicas de UPD realiza: uso de gaze umedecida com soro fisiológico a 0,9% para limpeza e mantimento da umidade do ferimento; desbridamento para a remoção de tecidos desvitalizados ou impregnados com substâncias estranhas que não foram removidos com a limpeza; e uso de curativo, pomadas ou extratos medicinais [17], [26]. No Quadro 1 há um resumo dos cuidados com a UPD para promoção da cicatrização [17].

Quadro 1. Resumo dos cuidados e objetivos das ações para o tratamento das úlceras de pé diabético.
Fonte: Manual do Pé diabético do Ministério da Saúde, BRASIL, 2016, [17] com adaptações.

Cuidados com UPD	Objetivo
Terapia Tópica	Manter a úlcera limpa, úmida e coberta, favorecendo o processo de cicatrização. Realiza-se a troca do segundo curativo diariamente.
Troca de curativo	Proporcionar limpeza das lesões, de modo que possa facilitar a avaliação da ferida com vistas à diminuição de riscos de infecção.
Limpeza da ferida	Remover de qualquer corpo estranho, agente tópico residual, fragmento de curativo anterior, exsudato da lesão, resíduo metabólico ou sujidade que possa interferir na evolução natural e reparação dos tecidos lesionados e na integridade das regiões circundantes
Desbridamento	Remoção dos tecidos inviáveis por meio de mecanismo autolítico, enzimático, mecânico ou cirúrgico.

Em relação ao uso de curativos, destaca-se o uso de gazes e bandagens e de curativos mais modernos como curativos de membrana permeável ou semipermeável (Tegaderm® e Opsite®), curativo de espuma semipermeável (Mepitel® e Urgotul®), curativo de hidrogéis, curativo de hidrocolóide (Granuflex® e NU DERM®) e curativo de alginato (Curasorb®, SeaSorb® e Sorbsan®) [27], [28]. Embora haja diversas alternativas farmacêuticas para o tratamento das UPD, essas terapias apresentam limitações de efetividade, custo e/ou viabilidade. No SUS, geralmente a terapia para UPD consiste no uso de hidrocolóide para manter a ferida úmida, ácidos graxos essenciais para formar uma película protetora na pele, alginato de cálcio para a absorção de fluídos e a sulfadiazina de prata para ação bactericida [26].

3.1.2 Sistema terapêutico de neoformação tecidual – Rapha®

Métodos alternativos para suprimir as dificuldades enfrentadas no tratamento das UPD devem ser levados em consideração. A busca constante de intervenções efetivas que impeçam a amputação de membros em portadores de DM é de extrema relevância. Assim, considerando que a UPD representa um grave problema de saúde público, a busca por estratégias terapêuticas eficientes é imprescindível. Em estudos realizados anteriormente pelo grupo, observou-se a correlação da redução do estresse oxidativo em úlceras diabéticas com melhor cicatrização das feridas ao utilizar biomaterial de látex natural e LEDterapia [29]. Nosso grupo desenvolveu um sistema terapêutico para neoformação tecidual (Rapha®), o qual consiste no uso concomitante de curativo baseado em biomembrana de látex natural (BLN), oriundo de *Hevea brasiliensis*, e de dispositivo de fototerapia (Figura 3.2. Curativo baseado em biomembrana de látex natural e equipamento móvel, componentes do Kit Rapha. Foto: Beatriz Ferraz/Secom UnB. Fonte: <https://unbciencia.unb.br/exatas/68-engenharia-eletronica/539-projeto-rapha-acelera-cura-para-o-pe-diabetico>, acessado em 23 de dezembro de 2022.). Esta terapia apresentou boa relação custo-benefício clínico, visto que foi mais eficaz que o tratamento padrão-ouro utilizado no SUS para cicatrização de UPD. Recentemente, o sistema Rapha® foi aprimorado por meio da adição de curcumina à BLN (BioCur), dado o elevado potencial terapêutico deste composto bioativo. Destaca-se que ensaios clínicos preliminares ($n = 5$) evidenciaram que este sistema, Rapha® plus (BioCur + fototerapia), promoveu cicatrização superior ao tratamento convencional do SUS e ao tratamento com o Rapha® convencional, porém não apresentou efeito antimicrobiano [6].

O látex natural é obtido da seringueira (*Hevea brasiliense*) e amplamente utilizado na obtenção de diversos materiais, apresentando biocompatibilidade [30] e, por isso, utilizado para diversas aplicações biomédicas [10], [31], [32]. Estudos demonstram que o látex natural tem capacidade de induzir a regeneração e neoformação tecidual, além de possuir um custo baixo de obtenção para tratamento de cicatrização, quando comparado a outros métodos tradicionais disponíveis no mercado [33].

O dispositivo diodo emissor de luz (LED, do inglês *Light-Emitting Diode*) utilizado para fototerapia possui trinta LEDs de alto brilho com comprimento de onda que variam de 480 a 650 nm e densidade total de energia igual a 25 J/cm² [6]. O dispositivo mostrou-se eficiente no aceleração da cicatrização de úlceras diabéticas, promovendo a neoformação e reepitelização tecidual [6], [8], [9], [34].

Estudos têm demonstrado que o tratamento com o sistema terapêutico Rapha® permitiu uma melhora significativa da qualidade de vida do paciente, visto que o tratamento é feito em casa, evitando sua locomoção até a unidade de saúde; é de fácil utilização; e, o mais importante, promove excelentes resultados [6].



Figura 3.2. Curativo baseado em biomembrana de látex natural e equipamento móvel, componentes do Kit Rapha. Foto: Beatriz Ferraz/Secom UnB. Fonte: <https://unbciencia.unb.br/exatas/68-engenharia-eletronica/539-projeto-rapha-acelera-cura-para-o-pe-diabetico>, acessado em 23 de dezembro de 2022.

Por exemplo, em um estudo clínico realizado com portadores de UPD, feito por Santana [6], foi demonstrado que o percentual médio de contração da ferida dos pacientes tratados pelo SUS foi de 22%, enquanto pacientes que realizaram o tratamento com o protótipo Rapha® obtiveram um percentual médio de contração da ferida de 41%. Quando houve a associação de lipossomas contendo curcumina à BLN, o percentual de contração da ferida aumentou consideravelmente para 90%, o que corresponde a uma melhora clínica de 70% quando comparada ao padrão-ouro utilizado pelo SUS para tratamento de UPD.

Esses resultados mostram que a presença da curcumina foi mais eficaz para cicatrização tecidual. Apesar disso, o BioCur não apresentou efeito antimicrobiano [6]. Considerando que infecções bacterianas estão relacionadas com o agravamento da ferida e aumento das chances de amputações, este trabalho consiste no desenvolvimento metodológico para produzir um protótipo de curativo aprimorado baseado em BLN e bioativos com propriedades farmacológicas favoráveis à potencialização da cicatrização bem como antimicrobianas.

3.2 REGENERAÇÃO CELULAR

Os ensaios de migração e reepitelização são de considerável interesse no contexto de estudos relacionados à regeneração tecidual. Devido à demora crônica no processo de cicatrização das UPD, a realização de estudos-piloto em linhagens celulares torna-se fundamental para compreender os efeitos fisiológicos e explorar a aplicação de novas terapias com o objetivo de acelerar o fechamento de feridas. A migração desempenha um papel crucial ao afetar diversos aspectos fisiológicos, incluindo a reepitelização da pele durante o processo de cicatrização de feridas [35].

A pele, como a barreira mais externa do nosso corpo, está sujeita a ataques diários do ambiente externo, tornando o reparo eficiente de feridas vital para a nossa sobrevivência. Esse processo depende da orquestração delicada de diferentes eventos celulares e moleculares em uma sequência temporal, em que cada etapa desempenha um papel fundamental [36]. Em pacientes portadores de UPD, esta barreira mecânica encontra-se rompida uma vez que a úlcera apresenta uma lenta cicatrização, deixando o ferimento suscetível a infecções, e, conseqüentemente, piora do quadro do ferimento.

Ao longo do processo de reparação tecidual de um ferimento, uma série de interações celulares e eventos fisiológicos ocorrem de maneira coordenada. Durante as fases intermediária e final do processo de cicatrização de feridas, ocorrem interações celulares que são dominadas pela interação entre queratinócitos e fibroblastos e essa interação progressivamente altera o microambiente, transformando o tecido de granulação inflamatório em um tecido de granulação direcionado à síntese [37].

Devido a sua presença na epiderme e a sua relação direta com o processo de regeneração, o estudo *in vitro* de queratinócitos e fibroblastos oferece a oportunidade de esclarecer dúvidas específicas, principalmente no âmbito de terapias alternativas para a regeneração tecidual e futuramente, no tratamento de UPD.

A epitelização ocorre por meio da migração e proliferação de queratinócitos a partir das bordas da ferida, bem como pela diferenciação de células-tronco localizadas nos bulbos remanescentes do folículo piloso [38]. Os fibroblastos desempenham um papel essencial tanto no desenvolvimento dos pelos como na pele interfolicular. Além disso, eles têm uma função crucial durante a cicatrização de feridas cutâneas e na bioengenharia da pele, interagindo com as células epidérmicas [39].

O ensaio de migração celular é uma técnica fácil e barata, que permite avaliar a taxa de migração de células aderentes, como queratinócitos e fibroblastos. Neste ensaio, as células que são inibidas por contato são cultivadas em uma superfície 2D até formarem uma camada única e contínua. Posteriormente, uma faixa de células é removida por meio de raspagem mecânica da camada celular. Em resposta, a camada celular se espalha e as células migram para preencher a região desprovida de células, fechando assim a ferida [11]. Este ensaio permite a combinação de bioativos terapêuticos que podem potencializar a cicatrização de úlceras.

Os estudos *in vitro* complementam os estudos *in vivo* e, posteriormente, ensaios clínicos. Indivíduos com diabetes enfrentam dificuldades na formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), o que resulta em um déficit na capacidade de cicatrização de feridas.

As UPD são ferimentos crônicos e caracterizadas por uma perda progressiva das fibras nervosas periféricas causada pela diminuição do fluxo sanguíneo e pelo alto nível glicêmico [12], prolongando o processo de cicatrização da úlcera. À vista disto, estudos de migração celular possibilitam a compreensão das concentrações de dosagem de fármacos e/ou biomateriais a serem testados como potencializadores no processo de regeneração tecidual.

O estudo com modelos de linhagens celulares aderentes é de grande importância para estes aspectos. Estudos confirmaram que os fibroblastos estimulam a migração, proliferação, alinhamento e formação de tubos nas células endoteliais através da produção de fator de crescimento endotelial vascular e outros fatores de crescimento, interações cruciais para a angiogênese [13]. Os fibroblastos migram independentemente enquanto queratinócitos e células endoteliais migram como uma folha contígua, padrões de migração *in vitro* que refletem o comportamento celular *in vivo*, validando os resultados [14]. Estudos de migração em células 2D têm sido realizados para modelos de feridas em UPDs [14], como estudos de eventos de nitração de proteínas em fibroblastos sob condições diabéticas.

3.3 URUCUM (*BIXA ORELLANA L.*)

Considerando que infecções bacterianas estão relacionadas com o agravamento da ferida e aumento das chances de amputações, neste trabalho buscou-se por usar biocompostos do urucum, dado suas excelentes propriedades antimicrobiana e antioxidante favoráveis à regeneração tecidual.

O urucum foi encontrado pelos povos europeus com a chegada dos espanhóis no Mundo Novo, no qual o fruto já era usado pelos maias e astecas. Os astecas, por exemplo, usavam-no como corante para tecidos, corpo e na bebida de cacau com baunilha [40]. Desde então, o urucum tem sido empregado em várias partes do mundo para prevenir e tratar uma ampla gama de condições de saúde, tais como constipação, febre, azia, asma, sarna, úlceras, diarreia, diabetes, entre muitos outros [41].

Com base na medicina tradicional, a semente de urucum apresenta propriedades laxante, cardiotônica, expectorante e antibióticas. Além disso, o óleo e a infusão das folhas são aproveitados para tratamentos de saúde como bronquite e inflamação ocular [42]. A utilização contínua do urucum pelos povos indígenas ao longo dos tempos, evidencia a importância do conhecimento empírico no estudo das propriedades terapêuticas dessa planta. Reconhecido como um corante natural proeminente, ocupa a segunda posição em importância econômica dentre tais aditivos [43]. Possui notáveis propriedades antioxidantes e sua tonalidade varia entre o vermelho e o amarelo, dependendo da quantidade de compostos coloridos presentes na camada externa [44].

As sementes são envoltas por um material resinoso de cor vermelha, o qual possui como principal pigmento o carotenoide bixina, de natureza lipossolúvel. Além disso, existe um segundo pigmento importante: o carotenoide norbixina, obtido a partir da saponificação da bixina, principal constituinte das preparações hidrossolúveis, porém ocorrendo em menor quantidade em massa nas sementes [32]. A bixina é um carotenoide lipossolúvel que carece de atividade pró-vitamina A e é um dos supressores biológicos mais eficazes do oxigênio molecular singlete (1O_2) e eliminadores de radicais livres [45].

Este carotenoide foi o primeiro cis-carotenoide a ser isolado de fontes naturais; algumas sementes contêm bixina em níveis de até 80% do pigmento total [43], [45]. Os carotenoides – bixina e norbixina – são amplamente pesquisados por apresentarem ações antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes. Estes biocompostos são eficazes contra microrganismos patogênicos de ocorrência em úlceras como fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [10]. Por exemplo, o carotenoide norbixina induziu atividade antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* [46].

Foi descrito que o carotenoide bixina inibe a resposta inflamatória aguda e acelera a reepitelização, contração da ferida e maturação do colágeno, apresentando elevado potencial para o tratamento de úlceras [47]. Ainda, foi relatado que o extrato de semente de urucum

induziu a aceleração das primeiras fases cicatriciais de feridas cutâneas em modelo animal [48], demonstrando seu potencial como fitoterápico no tratamento de infecções microbianas e cicatrização de feridas.

Para este trabalho, foi realizada uma análise bibliométrica. Realizou-se uma busca na base de dados PubMed no dia 28 de junho de 2023, com o termo “annatto” e encontrou-se 280 resultados nesta base. A palavra *annatto*, que em inglês significa urucum, apresentou o primeiro estudo no ano de 1946 (1). É possível observar na Figura 3.3. Número de publicações por ano do termo “annatto” na base de dados PubMed. Busca realizada no dia 28 de junho de 2023. o número de publicações por ano de estudos relacionados ao urucum. Observa-se que o número de publicações aumenta gradativamente com o passar dos anos. Entre os anos de 1946 e 1981 houve em média, uma publicação por ano. Nos anos 2000 houve um aumento de trabalhos publicados com este termo, com tudo, no ano de 2011, houve um aumento expressivo de publicações nesta base de dado, chegando até 25 publicações em 2019.

Ao realizar a busca do termo “annatto” na base de dados Embase, no dia 28 de junho de 2023, foram encontradas 77 publicações. Destes, 16 foram publicados somente na Embase, 44 na Medline e 17 na Embase e Medline juntos. São 63 artigos originais, 7 revisões e 1 nota. Dentre as palavras-chave mais recorrentes nestes trabalhos, está a palavra “carotenóide”, seguida pelo “extrato de planta”. Isso evidencia o crescente interesse na investigação das propriedades terapêuticas associadas aos carotenóides do urucum.

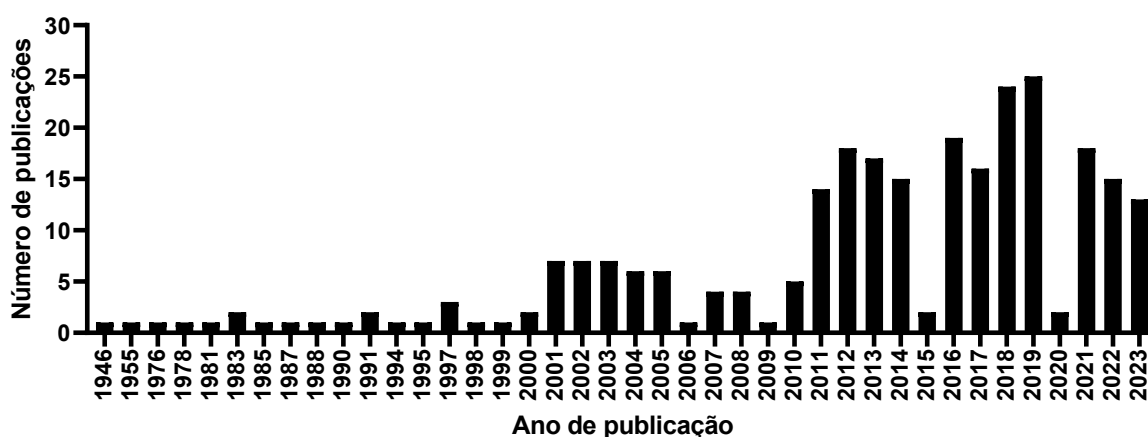


Figura 3.3. Número de publicações por ano do termo “annatto” na base de dados PubMed. Busca realizada no dia 28 de junho de 2023.

Além da análise do número de publicações relacionadas ao urucum, foi realizada uma análise bibliométrica com o termo “annatto” na base de dados PubMed (busca feita no dia 28

de junho de 2023). Com o auxílio do software VOSviewer (versão 1.6.18), foram encontrados diversos termos correlatos, como “carotenoides”, “agente colorante de comida”, “extrato de planta”, “bixa orellana”, “agente anti-infeccioso”, entre outros termos, conforme a Figura 3.4. As palavras-chave mais utilizadas nos estudos analisados foram “bixaceae”, que é o termo referente ao urucum, e “extrato de planta”, ambos com 7 ocorrências e 72 ligações com outros termos correlatos. O termo “carotenoide” também apresentou uma alta correlação, sendo de 6 ocorrências e 53 ligações com termos correlatos.

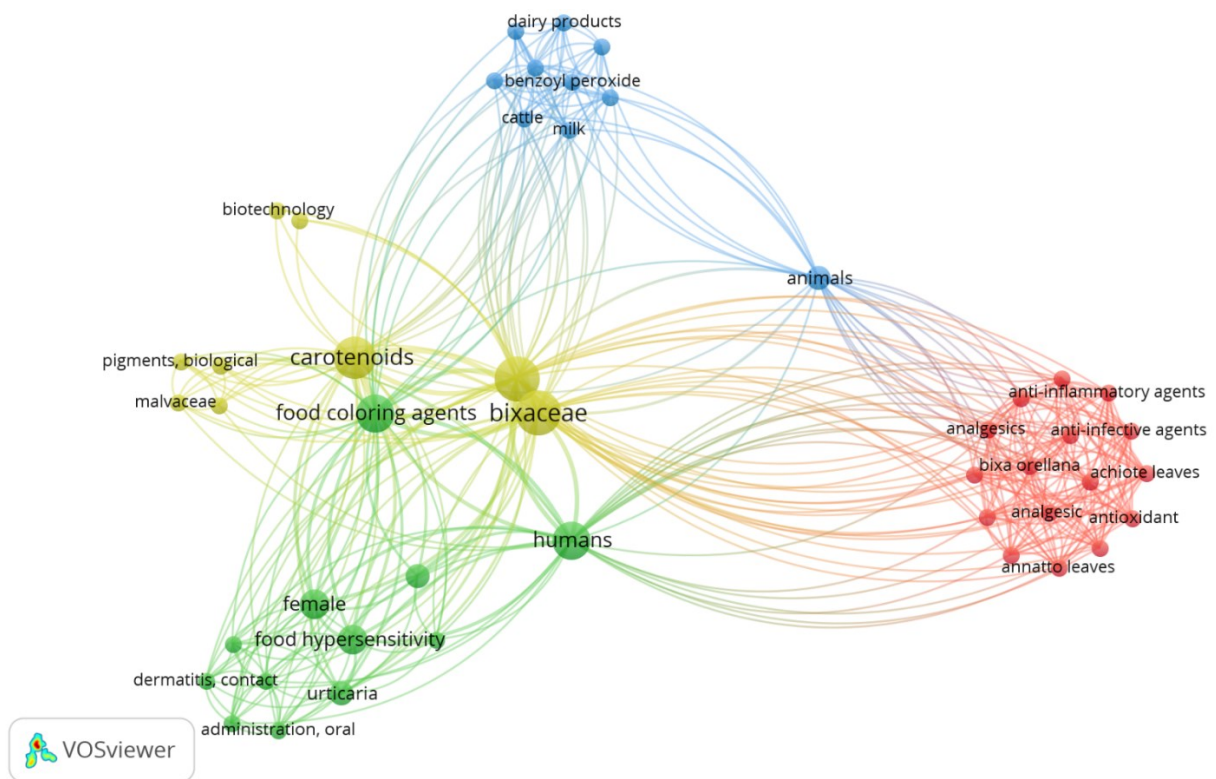


Figura 3.4. Análise bibliométrica do termo “annatto” na base de dados PubMed. Busca realizada no dia 28 de junho de 2023. Utilizado o *software* VOSViewer.

Neste estudo, foi selecionado o extrato de urucum para avaliação de seu potencial na regeneração celular, bem como seu potencial de atividade antioxidante. Tem-se por hipótese que o extrato de urucum tem enorme potencial terapêutico, visto seu efeito antioxidante e impacto na regeneração celular, relatados na literatura.

3.3.1 Urucum e a Bioeconomia

O pigmento derivado do urucum tem desempenhado um papel significativo tanto do ponto de vista econômico quanto cultural, sendo utilizado como corante tradicional e como aditivo em diversos setores [40]. Ainda na época da colonização da América do Sul pelos espanhóis,

já existia um comércio de longa distância entre diferentes grupos das terras baixas, como os Guaycuru, Arawak e Guarani, que se dedicavam ao cultivo do urucum [49]. Segundo Giuliano, até 2003, a produção anual média de sementes de urucum atingiu 10.000 toneladas, onde dois terços desse volume eram vendidos como sementes, enquanto o restante era comercializado na forma de extrato de sementes [40].

A América Latina é responsável pela maior parte da produção de urucum, representando mais de 85% da produção global [50]. A semente do urucum apresenta um carotenoide exclusivo, a bixina, que é de grande importância na indústria alimentícia, pois serve como corante que pode substituir os sintéticos [51].

A semente possui em torno de 80% de níveis de bixina em sua composição, carotenoide que apresenta uma coloração amarelo-vermelhada e características lipossolúveis [52], enquanto a norbixina, carotenoide encontrado em menores níveis nas sementes, apresenta coloração marrom-escuro e tem despertado considerável interesse tanto na indústria quanto na pesquisa devido à sua capacidade de solubilidade em água [50].

O urucum desempenha um papel importante na bioeconomia devido à sua ampla aplicação e potencial de uso [50]. Como corante natural, substitui aditivos artificiais na indústria alimentícia. Além disso, suas propriedades medicinais e terapêuticas o tornam valioso na produção de produtos farmacêuticos e cosméticos [42]. Dessa forma, o urucum impulsiona setores como agricultura, alimentos, saúde e cosméticos na bioeconomia.

3.3.2 Extração de biocompostos do urucum

Considerando que os carotenoides predominantes nas sementes de urucum, a bixina e a norbixina, possuem valor econômico significativo e propriedades terapêuticas, vêm sendo estudados métodos eficientes para a extração desses compostos com base em suas características químicas. O objetivo é assegurar que o processo de extração seja eficiente, viável e sustentável.

As plantas são fundamentais na medicina tradicional e oferecem uma fonte comprovada de drogas farmacêuticas[53]. Os extratos vegetais são uma opção vantajosa, pois dispensam o uso de agentes tóxicos, radiação, altas temperaturas, cepas microbianas ou meios dispendiosos [54]. Como visto, as sementes de urucum são utilizadas amplamente pela medicina tradicional e os números de trabalhos publicados com o urucum vêm aumentando com o passar dos anos, como demonstrado na análise bibliométrica (Figura 3.4).

Os carotenoides bixina e norbixina (Figura 3.5) apresentam propriedades terapêuticas [10] e tem-se observado um crescente interesse em sua extração e utilização. Com o intuito de obter os biocompostos de forma eficiente, estão sendo investigadas técnicas específicas para sua extração.

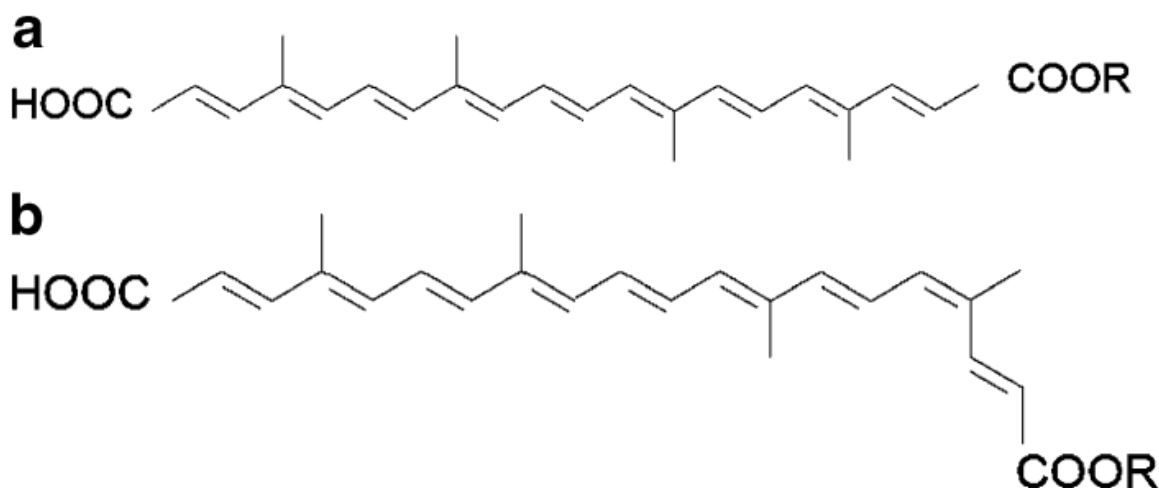


Figura 3.5. Estrutura química da (a) trans- e (b) cis-bixina (para $R = CH_3$) ou norbixina (para $R = H$) [55].

O método industrial de obtenção da bixina, consiste na saponificação da bixina em sal de norbixina por meio da utilização de solução alcalina e quantificado por espectrofotometria na região visível (457 nm) [56]. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), existem duas principais formas de se realizar a extração de sementes de urucum: o primeiro é a abrasão mecânica com óleo vegetal ou hidróxido de potássio, seguido pelo processamento direto dos extratos. Já a segunda, consiste na extração com solventes orgânicos [57]. Na extração com solventes, deve-se levar em consideração a complexidade da microestrutura da matriz vegetal, onde a eficiência da extração depende da estrutura molecular, tamanho e localização do soluto, bem como de suas interações com outros componentes [52]. No estudo realizado por Gómez-Linton, ao realizar a extração com solvente etanol 96% e acetato de isopropila, obteve-se um rendimento aproximado de 30% de bixina em sua amostra de semente de urucum [58].

A bixina, em maior concentração nas sementes de urucum, traz a característica de extrato lipossolúvel. A vista disso, estudos relatam que o solvente etanol mostrou-se um bom solvente para fase lipídica [52], [59], mesmo se tratando de um solvente polar. Isso pode ser devido à afinidade apolar que o solvente alcançou com a bixina [60]. Estudos que utilizaram o etanol

também relataram que na extração com este solvente nas temperaturas entre 40 e 60°C a obtenção de bixina é otimizada [52], [60].

Já no estudo feito por Rahmaliaa, a utilização da proporção de ciclohexano/acetona no rendimento da extração de bixina mostrou que existe diferença significativa ao aumentar a proporção de ciclohexano (60%) em relação a acetona (40%), resultando em um rendimento de 48% de bixina, cuja melhora foi possivelmente devido a um aumento da polaridade do solvente [61].

Dada a relevância da combinação entre a técnica de extração e o solvente para obter os compostos bioativos desejados, a utilização da técnica de Extração Acelerada com Solvente (ASE) preserva a bioatividade do extrato ao aumentar a eficiência da extração e reduzir o tempo necessário, tudo isso em baixas temperaturas [62]. A ASE é um processo automatizado que utiliza condições de alta temperatura e pressão para realizar extrações em um tempo reduzido [63].

Não foram encontrados estudos abordando a extração de bixina e/ou norbixina utilizando o método ASE. No entanto, considerando as condições favoráveis oferecidas por essa técnica, juntamente com os solventes adequados para a extração dos biocompostos presentes nas sementes de urucum, o método ASE apresenta-se como uma promissora abordagem para a obtenção desses carotenoides. Essa técnica de extração foi utilizada neste trabalho.

3.3.3 Caracterização de biocompostos do urucum

As substâncias responsáveis pela coloração do urucum são principalmente os carotenoides bixina ($C_{25}H_{30}O_4$) e norbixina ($C_{24}H_{28}O_4$), que podem ser encontrados nas formas “cis” e “trans” [55]. Existem diversas formas de caracterização de moléculas de interesse.

A espectrofotometria UV-visível é uma técnica analítica que se concentra na medição da absorção de radiação nas faixas de UV próxima (180-390 nm) e visível (390-780 nm) por substâncias químicas em solução, técnica amplamente utilizada para quantificar componentes químicos em amostras [64].

No estudo realizado por Scotter (1994), utilizou-se a espectrofotometria para avaliar a pureza dos isômeros de bixina e norbixina. Os resultados indicaram que os máximos de absorção e as varreduras espectrais foram semelhantes para os isômeros de cada carotenoide, dificultando sua distinção apenas pelos espectros [65]. Isso deve-se à semelhança na estrutura molecular destes biocompostos. Silva (2007) observou uma absorção típica dos carotenoides entre os comprimentos de onda de 420 a 480 nm [66].

Já análise cromatográfica é essencial para quantificar e identificar os carotenoides presentes no extrato, onde a técnica mais utilizada para esse fim é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que oferece resultados precisos e confiáveis [67]. Os instrumentos-padrão atuais de HPLC-MS/MS têm um nível de sensibilidade que normalmente permite a quantificação de compostos até uma concentração de aproximadamente 1 µg/L, sem etapas trabalhosas de pré-concentração da amostra [68]. A identificação do composto de interesse pode ser realizada através da análise da amostra comparada com o padrão, obtido de empresas com pureza confirmada ou em comparação com a literatura.

Vogeser (2008) relata uma análise UPLC analítica (do inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) em 460 nm, na qual houve 91% de pureza para o isômero de bixina isolado do extrato de urucum, com o pico em 20,95 minutos, corroborando estudos anteriores analisados pelo autor [69]. Com base nas características de tempo de retenção das moléculas e comprimento de onda de absorção, Silva (2007) relata que foi possível identificar e quantificar teores de bixina e norbixina em seus extratos de urucum, com a bixina correspondendo a 92% dos carotenoides e a norbixina, a 2% [66], como corrobora a literatura. Assim, a utilização de metodologias analíticas voltadas à identificação e quantificação de biocompostos de interesse reveste-se de significativa importância no contexto da determinação das substâncias responsáveis por atividades terapêuticas específicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir será apresentado brevemente um resumo das etapas experimentais realizadas neste trabalho. Na primeira etapa realizou-se a obtenção, extração e caracterização de extratos de urucum. Foram realizadas análises relacionadas à biocompatibilidade e potencial antioxidante e regenerativo dos extratos de urucum em cultura de células de queratinócitos e fibroblastos. A seguir são apresentadas cada uma destas etapas de maneira esquemática (Figura 4.1).



Figura 4.1. Resumo das etapas experimentais realizadas neste trabalho. Etapa 1: obtenção das amostras de urucum; etapa 2: extração de biocompostos das sementes; caracterização dos compostos dos extratos de *Bixa orellana* por espectrofotometria e cromatografia.

4.1 OBTENÇÃO DAS SEMENTES E CORANTES DE *BIXA ORELLANA* L.

As sementes de urucum foram adquiridas em abril de 2021 de uma comunidade quilombola, localizada na Região Administrativa do Paranoá (a 17 km de Brasília, 15°48'35.3"S, 47°46'36.2"W) (Figura 4.2). As sementes foram trituradas e mantidas sob proteção de luz até seu uso para evitar oxidação devido à fotossensibilidade dos biocompostos bixina e norbixina que são fotossensíveis e estão presentes nas sementes de urucum.

Corantes naturais de urucum e extrato bruto foram doados pela empresa New Max® (<https://www.newmaxindustrial.com.br/>), líder nacional na comercialização de corantes naturais alimentícios. Foram obtidos 500 g de Norbixina em pó (NRBX, código FT 500421110XX), 500 g de extrato bruto em pó (EB, código FT 500421114XX) e 500 g de Suspensão Oleosa de Bixina a 5% (BIX, código 500425502XX).



Figura 4.2. Planta nativa (*Bixa orellana*) onde foram colhidas as sementes de urucum para os ensaios de extração e caracterização.

4.2 EXTRAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS DE SEMENTES DE URUCUM

Os biocompostos bixina e norbixina são os carotenoides encontrados em maior abundância em sementes de urucum [41]. Foi feita a extração destes compostos a partir das sementes de urucum trituradas através do uso de distintos solventes. A extração de biocompostos foi realizada por meio do equipamento “Extrator por Solvente Acelerado” (ASE-150, **Figura 4.3**), o qual permite a extração de compostos sólidos e/ou semissólidos utilizando-se solventes, calor e alta pressão [70].



Figura 4.3. Equipamento de Extração Acelerada por Solvente – 150, utilizado para extração por solvente das sementes de urucum (ASE -150 - do inglês *Accelerator Solvent Extractor*)

A seguir será descrita a metodologia de extração de biocompostos a partir de 15 g de sementes de urucum trituradas. A massa de sementes foi adicionada a uma cela de extração de aço inox com capacidade de 100 mL, própria do ASE-150. Para realizar a extração dos biocompostos, foram utilizados os solventes acetato de etila, hexano e etanol. O solvente determinado para cada amostra foi adicionado automaticamente em frasco próprio do

ASE-150. O equipamento foi programado para execução de dois ciclos de três minutos sob temperatura de 50°C e de 130°C. Os passos desta etapa estão apresentados na Figura 4.4. Decorrido esses ciclos, os extratos foram transferidos para um balão de vidro e submetidos ao rotaevaporador para evaporação do solvente. As amostras adquiridas foram identificadas de acordo com o Quadro 2.

Quadro 2. Identificação das amostras de extrato de urucum de acordo com o solvente e temperatura utilizados.

Amostra	Solvente e temperatura utilizados
H50	Hexano a 50°C
H130	Hexano a 130°C
AE50	Acetato de Etila a 50°C
AE130	Acetato de Etila a 130°C
E50	Etanol a 50°C
E130	Etanol a 130°C

Após a evaporação de quase todo o solvente, o extrato, contido no balão de vidro, foi retirado com auxílio de pipeta de vidro de Pasteur e transferido para frascos de vidro âmbar previamente pesados e identificados. Em seguida, acondicionou-se os frascos abertos para secagem do solvente restante em capela, sob proteção da luz. Transcorridos sete dias, os extratos encontravam-se secos e foram submetidos ao liofilizador para secagem completa dos solventes.

Para o cálculo de rendimento de cada amostra, foi utilizada a equação “Cálculo de rendimento”, conforme o Quadro 3. O cálculo de rendimento consiste na pesagem do frasco antes com a amostra após o processo de extração das sementes, e em seguida, subtrai-se o peso do frasco vazio, antes de se ter a amostra [71]. Dessa forma, obtém-se o valor do peso somente da amostra após a extração. A empresa New Max forneceu o protocolo utilizado para a obtenção da porcentagem de teor de bixina e norbixina (Quadro 3).

$$\% \text{ Bixina} = \frac{\text{Absorbância} \times \text{Diluição}}{E^{1\%1 \text{ cm}}}$$

$$\text{Diluição} = \frac{\text{volume do 1}^{\circ} \text{ balão} \times \text{volume do 2}^{\circ} \text{ balão}}{\text{alíquota do 1}^{\circ} \text{ balão}}$$

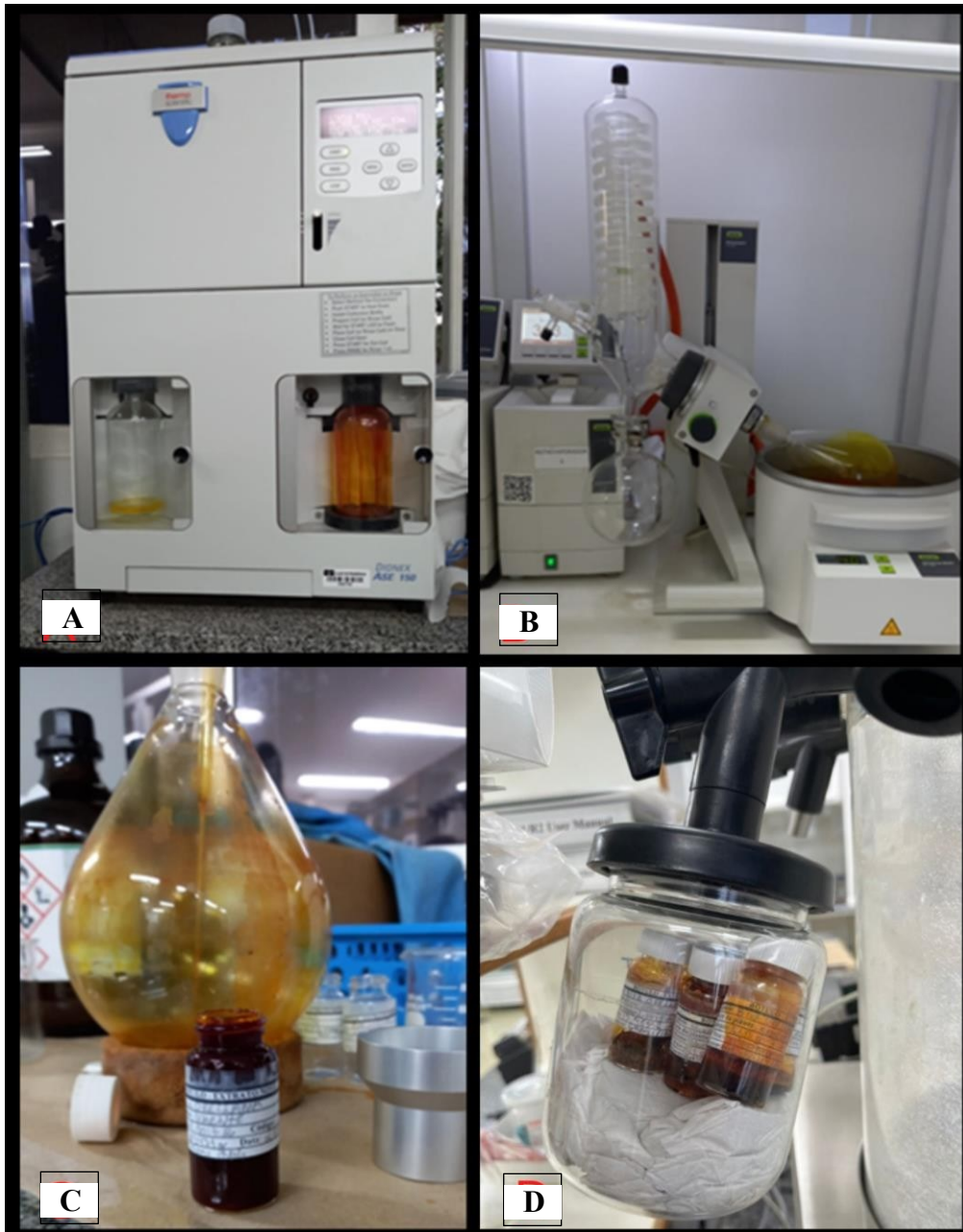


Figura 4.4. Etapas e equipamento utilizado na extração de biocompostos de urucum. A) Extrator por solvente acelerado, B) Rotaevaporador, C) Transferência do extrato do balão volumétrico para o frasco de vidro identificado e D) Liofilizador.

Quadro 3. Equações de cálculo de rendimento de extrato bruto, porcentagem de bixina e norbixina e cálculo de diluição das amostras de extrato de urucum.

Denominação do cálculo	Equação
Cálculo de Rendimento	Rendimento = (peso com o frasco com amostra) - (peso do frasco sem amostra)
Cálculo de Diluição	$Diluição = \frac{volume\ do\ 1^o\ bal\c{a}o \times volume\ do\ 2^o\ bal\c{a}o}{aliquota\ do\ 1^o\ bal\c{a}o}$
Porcentagem de Bixina	$\% Bixina = \frac{Absorb\c{a}ncia \times Dilui\c{c}\c{a}o}{m \times E^{1\%1\ cm}}$
Porcentagem de Norbixina	$\% Norbixina = \frac{Absorb\c{a}ncia \times Dilui\c{c}\c{a}o}{V \times E^{1\%1\ cm}}$
Siglas	
m: Massa da amostra em gramas (g)	
E1%1 cm: Coeficiente de absorvidade da bixina (3090) e da norbixina (2850)	
V: Volume pipetado da amostra em mL	

4.3 CARACTERIZAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS DE *BIXA ORELLANA L.*

A fim de se determinar o teor de carotenoides bixina e norbixina, obtidos da empresa NewMax®, realizou-se análises cromatográficas e por espectrofotometria. A determinação do teor de bixina e norbixina possibilita inferir sobre a qualidade do método de extração. Por isso, foram feitas análises do teor de bixina e norbixina utilizando dois métodos, conforme descrito a seguir.

4.3.1 Análise de teor de bixina e norbixina por meio de espectrofotometria

O espectrofotômetro é um aparelho que permite medir a absorção de luz de uma determinada solução. Análises por espectrofotometria possibilitam compreender se há compostos nos extratos que apresentem absorção na mesma faixa de comprimento de bixina e norbixina pré-definida como sendo no espectro de 487 nm.

Para o preparo da solução a fim de se determinar o teor de norbixina, pipetou-se 1 mL da amostra a ser analisada. Essa amostra foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL. Para completar o volume do balão, utilizou-se hidróxido de potássio (KOH) a 0,5% e a solução foi homogeneizada, resultando na primeira diluição. Posteriormente, 1 mL dessa primeira diluição foi pipetado e transferiu-se a amostra para um novo balão volumétrico de 100 mL. Novamente, o volume foi completado com hidróxido de potássio (KOH) a 0,5% e a solução foi homogeneizada, obtendo-se a segunda diluição. Por fim, realizou-se a leitura da absorbância

da segunda diluição no espectrofotômetro, no comprimento de onda especificado de 487 nm, utilizando como branco o hidróxido de potássio (KOH) a 0,5%.

Já para o preparo da solução a fim de se determinar o teor de bixina, pesou-se 0,1000g e foi colocada em um balão volumétrico de 50 mL. Na capela, adicionou-se 10 mL de acetona para dissolver a amostra e o volume do balão foi completado com acetona, obtendo-se a primeira diluição. Posteriormente, transferiu-se 1 mL da primeira diluição para um novo balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com acetona, realizando-se a segunda diluição. Por fim, foi feita a leitura da absorvância da amostra no espectrofotômetro, utilizando um comprimento de onda de 487 nm e uma cubeta de 1 cm, tendo a acetona como branco de referência.

Neste trabalho, as amostras de sementes *in natura* extraídas por ASE-150 e aquelas obtidas pela empresa New Max® foram submetidas à análise em espectrofotômetro (modelo LAMBDA XLS, L7110189) utilizando comprimento de onda de 487 nm. Os solventes hidróxido de potássio e acetona foram usados como branco (controle), visto que foram os solventes utilizados para realizar as diluições das amostras. Para o cálculo de porcentagem do teor de bixina e norbixina, tanto das amostras da New Max quanto as amostras de sementes *in natura*, extraídas por solventes, foram utilizadas as equações conforme Quadro 3.

4.3.2 Análise de teor de bixina e norbixina por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE é uma técnica de separação analítica para análises qualitativas e quantitativas de determinada amostra. Esta técnica apresenta alta sensibilidade e se caracteriza pela separação de espécies não voláteis e termicamente instáveis. O modelo do sistema de controle utilizado neste estudo foi o CBM-20A com duração da corrida de 30 minutos. O modelo da bomba foi LC-20AD com modo de gradiente binário e fluxo foi de 1 mL/min. O solvente na bomba A foi água e na bomba B foi metanol, com pressão máxima de 260 kgf/cm² e pressão mínima igual a 0 (zero). O modelo do detector foi o de SPD-M20A com lâmpada D2&W. A corrida foi programada como fase móvel empregando-se água (A) e metanol (B), com fluxo de 1mL/min. A eluição consistiu em gradiente linear, partindo de 60% de B, 0-5 min; 60 a 70%, 5-10 min; 70 a 90%,10-15 min; 90 a 100%, 15-20 min; e 100%, 20-30 min. Todas as análises foram realizadas no comprimento de 450 nm, na qual se tem absorção máxima da bixina [72].

A varredura foi realizada nas faixas de comprimento de onda de 190-800 nm. As análises foram realizadas em parceria com o Laboratório de Ciências Químicas (LCQUI) da

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), no Centro de Ciências e Tecnologia (CCT), sob supervisão do Dr. Ivo José Curcino Vieira. A análise da amostra de corante de suspensão oleosa de bixina não foi realizada por entraves de logística no envio da amostra de Brasília ao Rio de Janeiro, por ser conteúdo líquido. Assim, ainda pretende-se realizar a análise por meio de CLAE desta amostra em breve.

Foram realizadas varreduras de nove amostras, sendo seis obtidas por extração em ASE-150 e duas amostras obtidas pela empresa New Max (corante natural de urucum: norbixina - e corante de extrato bruto de urucum). Utilizou-se como padrão bixina comercial (Sigma®, Catálogo nº 6983-79-5 com pureza > 90%). Este padrão foi utilizado para determinar o tempo de retenção do biocomposto bixina em comparação com os picos obtidos na leitura das nove amostras avaliadas. As áreas dos picos obtidos nos cromatogramas do padrão de bixina e das amostras de urucum foram analisadas em *software* próprio do cromatograma (CBM-20A System Controller). Os valores de área do pico são correspondentes à bixina em relação ao extrato. Ou seja, os valores de porcentagem de área do pico, obtidos no cromatograma, correspondem à porcentagem do carotenoide bixina. A técnica CLAE foi empregada com o intuito de investigar com maior sensibilidade a presença do biocomposto de interesse, uma vez que o padrão adquirido correspondia à Bixina da Sigma.

4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO

O potencial antioxidante do extrato de urucum está associado à sua capacidade de inibir estresse oxidativo. Este dado é de suma importância visto que os radicais livres, formados durante o processo de estresse oxidativo, estão associados ao início da inflamação e as substâncias antioxidantes retardam, previnem ou interrompem o dano oxidativo causado pela inflamação [73].

4.4.1 Ressonância paramagnética eletrônica

Inicialmente foi avaliado o potencial de atividade fotodinâmica da amostra extraída por ASE-150 com Etanol a 130°C, visto que esta apresentou maior porcentagem de área para bixina na análise por CLAE. A terapia fotodinâmica (TFD) usa um corante sensível à luz e luz visível de baixa intensidade para tratar doenças. O corante é aplicado e ativado pela luz, produzindo radicais livres ou oxigênio singleto, que podem matar células e destruir tecidos doentes [74].

Também se utilizou suspensão oleosa de bixina, obtida pela empresa New Max a fim de se comparar os resultados. A seguir são descritos os passos metodológicos deste ensaio.

Foi preparada uma solução estoque de 10 mM de um marcador molecular de radicais livres – o *spin probe* 1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina (CMH, NOX-2, Noxygen, Alemanha). O marcador CMH possibilita a medição de concentrações muito baixas de espécies paramagnéticas, como o íon superóxido e não de espécies reativas de oxigênio (ERO) em geral [6].

Foram utilizadas duas condições experimentais para análise de atividade fotodinâmica das amostras sendo elas: (1) irradiação das amostras com diodo emissor de luz (LED) no comprimento de onda azul (450 nm) na potência de 200 mw (energia de 9.8 J) durante 1 minuto e (2) sem irradiação. A fotoestimulação no comprimento de onda de luz azul foi escolhida dado o potencial regenerativo desta faixa e pelo potencial em promover um aceleração no processo de cicatrização, consistindo, portanto, em uma associação terapêutica relevante [75].

Para realização desse ensaio, preparou-se duas soluções estoque de extrato de urucum a 19 mg/mL: (1) obtida por extração em ASE-150 com Etanol a 130°C e (2) fornecida pela New Max®. Em seguida, foi feita uma diluição da solução estoque a 1 mg/mL em DMSO (2%).

Visto que a solução estoque do extrato encontrava-se em uma concentração muito alta em comparação à estudos com o extrato de urucum em cultura de células [76], [73] realizou-se a diluição para se obter a concentração de 1mg/mL de extrato. Para isso, um volume de 379 µL de DMSO e 21 µL de cada amostra foi adicionado em poços de placas de 9 poços, seguido pela adição de 8 µL de CMH. Foi realizada triplicata para cada amostra. As etapas do procedimento estão elucidadas na **Figura 4.5**.

A partir da adição do CMH, se iniciou radiação com LED azul na solução por um minuto. Em seguida, adicionou-se o volume de cada poço em seringas de 1 mL (Figura 4.5.). As seringas foram acondicionadas em nitrogênio líquido para congelamento das amostras e levadas para a leitura no equipamento de ressonância paramagnética eletrônica (RPE). O mesmo procedimento foi realizado com as amostras em triplicatas sem a irradiação com LED azul.

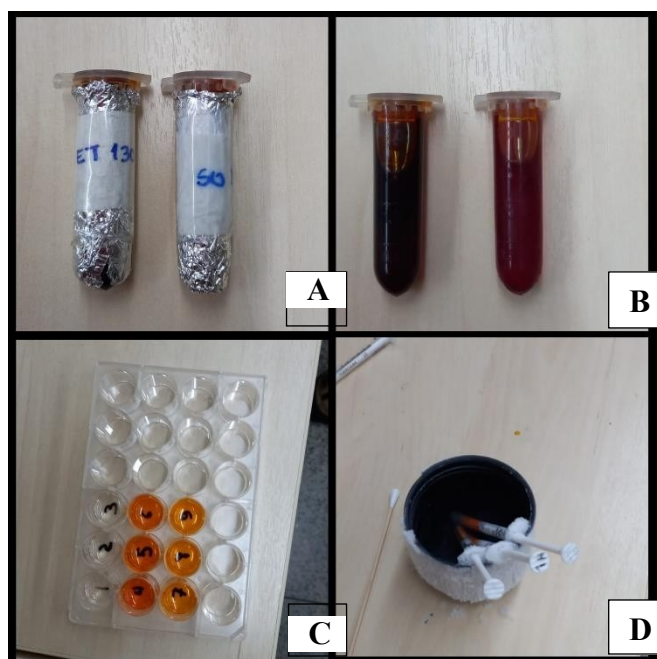


Figura 4.5. Amostras de extrato de urucum diluída em dimetilsulfóxido de Etanol extraído por ASE a 130°C(A) e Etanol a 50°C (B), alocadas em placas de 24 poços e (C) seringas com amostras de extrato de urucum congeladas no nitrogênio líquido (D).

4.4.2 Avaliação do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre (DPPH)

Para realização deste ensaio utilizou-se extrato de sementes de urucum extraída com solvente etanol a 50°C nas concentrações de 100 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Esta amostra foi determinada com base nos resultados de ensaios de rendimento de extrato e porcentagem de bixina e norbixina. Como controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico (Sigma, A7506-100G) nas mesmas concentrações, visto que este composto é considerado um potente antioxidante. O extrato de urucum foi diluído em DMSO a 1% e a solução de ácido ascórbico foi diluída em água ultrapura.

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um radical livre utilizado como indicador de atividade antioxidante em diversos produtos. A solução de DPPH foi preparada na concentração 0,04 mg/mL, diluindo-se 0,0012 g deste produto em 30 mL de Metanol. A seguir, a solução foi submetida a banho em ultrassom durante 30 minutos.

Feita a solução de DPPH, adicionou-se 150 μL da solução de DPPH, diluída em metanol, em poços de placa de 96 poços, conforme alocação dos grupos experimentais conforme o esquema representado Figura 4.6. Em seguida, nos poços que possuíam já a solução de DPPH, foi adicionado 150 μL por poço das amostras de extrato de urucum nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$, e 150 μL por poço de ácido ascórbico nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$,

totalizando o volume final de 300 µL por poço. Também adicionou-se 300 µL em três poços para realização do cálculo da porcentagem de atividade antioxidante (%AAO) [77]. As placas permaneceram em temperatura ambiente, cobertas com papel alumínio para serem protegidas da luz. O esquema está representado na Figura 4.7. O metanol foi utilizado como branco e a leitura foi feita a 517 nm em espectrofotômetro. As análises foram realizadas em triplicatas.



Figura 4.6. Esquema de alocação das amostras de Extrato de Urucum, Ácido Ascórbico, Metanol (Branco) e Solução de DPPH (Controle).

O cálculo para a porcentagem de atividade antioxidante consiste em:

$$\%AAO = \frac{(Abs\ controle\ DPPH - Abs\ amostra)}{Abs\ controle\ DPPH} \times 100,$$

onde “%AAO” é Porcentagem de atividade antioxidante e “Abs controle DPPH” é a absorvância da solução de DPPH.

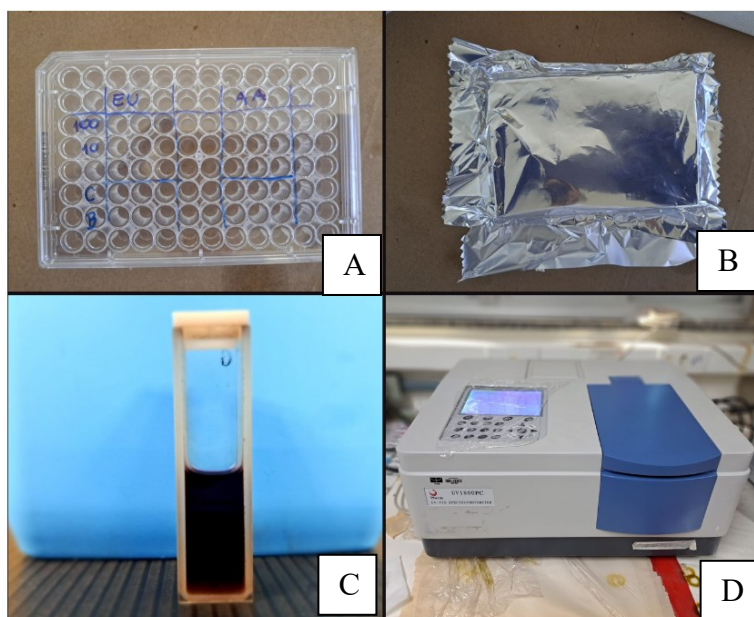


Figura 4.7. Representação dos procedimentos adotados no ensaio de potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH. Placa de 96 poços com as demarcações (A), método para manter no escuro (B), solução de DPPH diluído em metanol (C) e leitura em espectrofotômetro (D).

4.5 ENSAIOS *IN VITRO*

4.5.1 Cultivo de células

As linhagens celulares de origem humana de queratinócitos (HaCat) e de fibroblastos de linhagem primária, pois correspondem a tipos celulares abundantes na pele, representando, portanto, um adequado modelo *in vitro* para avaliação do potencial de regeneração. O uso da linhagem celular primária foi autorizado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Católica de Brasília (30175020.0.0000.5558). A seguir são descritos os procedimentos metodológicos para o cultivo das células.

A estocagem das células é feita utilizando-se criotubos que são armazenados em nitrogênio líquido a -195°C e, conforme necessário, são descongeladas. Brevemente será descrito o processo de descongelamento, que foi realizado, conforme necessidade. Primeiramente, o criotubo é colocado em banho-maria e depois o conteúdo dele é transferido cuidadosamente para tubo Falcon de 15 mL contendo 2 mL de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). Em seguida, o criotubo é centrifugado por três minutos a 2.000 g. O sobrenadante é descartado e o *pellet* de células é ressuscitado em 1 mL de meio. O conteúdo celular é então transferido para uma garrafa de 25 cm² para o cultivo de células com meio de

cultura DMEM, contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina em incubadora sob atmosfera úmida com 5% de CO₂ e a 37°C.

Para realização de ensaios biológicos, foram semeadas 5×10^3 células de queratinócitos/poço e 1×10^4 de fibroblastos [78] e mantidas em condições de cultivo por 24 horas. Para o cálculo de densidade, as células foram removidas do frasco de cultura. Para isso, o meio de cultura foi descartado e adicionou-se 3 mL de solução tampão de fosfato-salina (PBS) para remover os resíduos de meio. Em seguida, as células foram incubadas por 5 minutos com 5 mL de solução de tripsina com EDTA (do inglês *ethylenediaminetetraacetic acid*, ou *edetetic acid*) a 37 °C. Após este período, adicionou-se 5 mL de meio DMEM às células para neutralizar a ação da tripsina e seguiu-se com a centrifugação da suspensão celular por 5 minutos a 500 rpm. Após, o sobrenadante foi removido e o *pellet* de células ressuspendido em 1 mL meio. Em seguida, uma alíquota da suspensão de células foi usada para contagem de células em câmara de Neubauer, utilizando-se o método de exclusão por azul de Tripán para distinção de células viáveis e não viáveis [78]. A contagem das células era feita usando quatro quadrantes e utilizado o seguinte cálculo para obter o número de células por mililitro:

$$\frac{\text{Células contadas}}{\text{Nº de quadrantes contados}} \times \text{Fator de diluição (10)} \times 10^4$$

4.5.2 Tratamento das células com extrato de urucum

I) Preparação das soluções de tratamento

Com base nos resultados de caracterização das amostras de extrato e do corante de urucum, selecionou-se a amostra de extrato de sementes de urucum extraída com solvente etanol a 50°C para realização do ensaio de viabilidade celular para ambas as células: queratinócitos e fibroblastos. Este extrato foi selecionado devido a suas condições de rendimento bruto após a extração e porcentual de biocompostos de interesse: a bixina e norbixina.

Primeiramente, a solução estoque de extrato de urucum foi preparada na concentração de 40 mg/mL. Foram feitas duas diluições, sendo uma em DMSO e a outra em etanol (grau de pureza 99%), a fim de se verificar a condição ideal de solubilidade do extrato, dadas suas propriedades lipossolúveis. A bixina se destaca entre os carotenoides por sua presença natural na configuração *cis* e por conter dois grupos carboxílicos em sua molécula, um dos quais é um éster metílico [79]. Essa característica confere à molécula a capacidade de se dissolver em gorduras. Caso haja a hidrólise alcalina do grupo metílico, resultará no sal hidrossolúvel da

norbixina [79]. Além disso, o uso dos solventes DMSO e Etanol foram utilizados para conferência da toxicidade em relação as células.

Para isso, pesou-se 80 mg de extrato do urucum em um tubo de *ependorf* e adicionou-se 1 mL de DMSO. Este procedimento foi realizado em capela, sob o abrigo da luz, pois carotenoides do extrato como bixina e norbixina apresentam fotossensibilidade. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada em vórtex e, depois, adicionou-se mais 1 mL de DMSO e a mistura foi colocada em vórtex novamente. O mesmo procedimento se realizou utilizando com o solvente o etanol.

Como os solventes DMSO e etanol são tóxicos para células em concentrações acima de 1%, foi necessário realizar a atenuação da porcentagem desses solventes, diluindo a amostra também em PBS (tampão fosfato-salina). Assim, diluiu-se 50 µL da solução estoque de extrato de urucum (40 mg/mL) em 1950 µL de PBS, obtendo-se uma concentração de 1 mg/mL, visto que serão utilizadas concentrações na grandeza de microgramas (µg). A partir desta solução estoque preparou-se as soluções de uso para realização do tratamento. A solução mais concentrada, ou seja, de 80 µg/mL foi diluída diretamente no meio de cultura.

As doses testadas em cultura de células foram de 2,5 a 80 µg/mL de extrato de urucum e utilizou-se de diluição seriada para evitar vieses experimentais. Estas concentrações foram selecionadas com base nos achados prévios descritos na literatura em que estas doses mantinham a viabilidade celular acima de 80% *in vitro* [73], [76]. Após a obtenção da primeira concentração de 80µg/mL de extrato, foi realizada a diluição seriada até a concentração de 2,5 µg/mL, totalizando seis concentrações. As diluições seriadas foram de 80, 40, 20, 10, 5 e 2,5 µg/mL. Como controles experimentais utilizou-se a mistura de DMSO e Etanol em PBS. Também foi realizado o controle negativo utilizando-se somente meio DMEM.

II) Plaqueamento e tratamento das células

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^3 células de queratinócitos e de 1×10^4 de fibroblastos por poço e mantidas somente com meio DMEM para atingirem a confluência de no mínimo 80% antes de se iniciar o tratamento. Esta análise da confluência ocorre em até 24 horas e é feita com a observação da morfologia das células em microscópio invertido. Utilizou-se três placas de 96 poços para realização da análise de viabilidade após 24, 48 e 72 horas de tratamento com extrato de urucum, tanto diluído em DMSO como em etanol. Para aplicação dos tratamentos, o meio de cultura era removido e

adicionado um volume de 150 µL das soluções de tratamento (80 a 2,5 µg/mL) em cada poço. As placas foram mantidas em incubadora úmida a 37°C a 5% de CO₂ por 24, 48 ou 72 horas.

4.5.3 Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT

Para avaliação da biocompatibilidade e do potencial de citotoxicidade do extrato de urucum foi realizado o ensaio de viabilidade celular por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio).

Após os períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação, os tratamentos foram removidos e em cada poço foram adicionados 150 µL de uma solução de MTT a 0,5 mg/mL diluída em DMEM. As placas foram novamente colocadas na estufa e incubadas. Após um período de duas horas, a solução de MTT foi descartada e os cristais de Formazan formados foram diluídos com a adição de 150 µL de DMSO em cada poço. Devido à presença de precipitados de extrato no fundo dos poços, cada poço foi lavado com 150µL de PBS. A absorbância foi medida utilizando um espectrofotômetro com leitor de microplaca (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América) na frequência de 595 nm. Os dados foram normalizados com base nos valores de absorbância dos controles, utilizando o seguinte cálculo para determinar a porcentagem de viabilidade celular:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{Média da Abs do tratamento}}{\text{Média do controle}} \times 100$$

A absorbância obtida foi utilizada como indicativo do número de células viáveis no experimento e foi convertida em percentual. Todos os valores percentuais foram normalizados em relação ao controle (células sem tratamento), e um controle de DMSO (branco) em três poços sem células foi utilizado para descartar possíveis interferências desse reagente na análise [80].

4.5.4 Análise de potencial de regeneração *in vitro*: ensaio de migração celular

Para realização deste ensaio foram utilizadas células primárias de fibroblastos de origem humana. Trata-se de um tipo celular encontrado em abundância na pele e diretamente ligada ao processo de cicatrização. O ensaio de migração celular, ou “*scratch assay*”, consiste no plaqueamento das células e a efetuação de uma ranhura nas células aderidas, por meio do uso de uma ponteira de plástico para avaliação e registro do fechamento da ranhura.

Como tratamento, as células receberam extrato de urucum na concentração de 10 µg/mL, com base no ensaio prévio de MTT. As células 6×10^5 foram semeadas em placas de 24 poços.

Como controles experimentais, incluiu-se dois grupos sendo: (1) células tratadas com 1% de DMSO em meio DMEM e (2) células tratadas apenas com meio DMEM. O meio de cultivo foi suplementado apenas com 1% de Soro Fetal Bovino, suplementação mínima para que não interferissem no processo de migração celular. Este experimento foi conduzido com quadruplicatas.

A seguir serão descritos os procedimentos metodológicos deste ensaio. Após 24 horas do plaqueamento, foi feita uma ranhura na placa em linha reta, utilizando uma ponteira de 200 μL , conforme esquematizado na primeira imagem da Figura 4.8. Em seguida, adicionou-se 500 μL de PBS em cada poço para retirada das células que não estavam mais aderidas à placa. Neste momento, foi feito o registro fotográfico em microscópio invertido (Leica) acoplado a um notebook com um programa para captura das imagens – o LAS Z. Este processo foi feito nos tempos de zero, 24, 48 e 72 horas.

Posteriormente, as análises das imagens foram feitas por meio do programa Image J e ao pug-in (wound_healing_size_tool.ijm) para realização do cálculo da área “lesionada” em pixels e cálculo da porcentagem de redução da área com o passar dos tempos determinados.

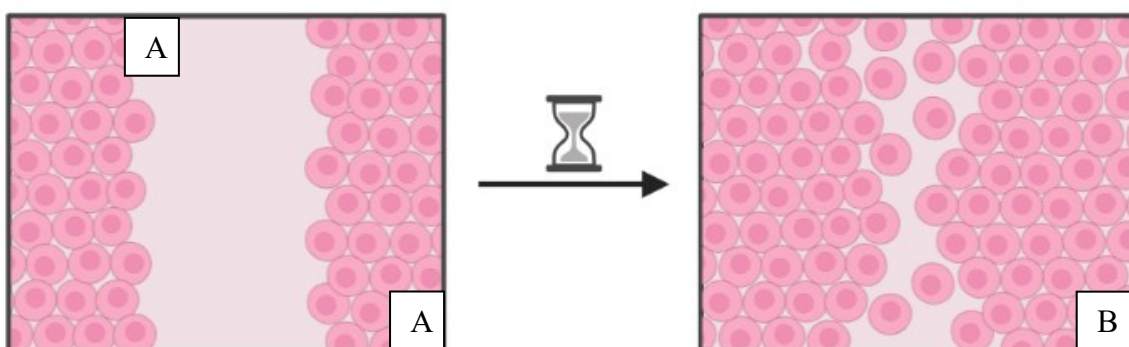


Figura 4.8. Simulação de migração celular após uma ranhura em células aderidas, onde em A apresenta o tempo 0 hora após a ranhura e o B representa após 24 horas da ranhura. Imagem criada pelo aplicativo BioRender.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a viabilidade celular, foram conduzidos três ensaios independentes, cada um com triplicatas, totalizando nove replicatas ao final. Os valores utilizados para análise foram a média e o desvio padrão. Já para a análise de Ressonância Paramagnética Eletrônica, o ensaio foi realizado em triplicata, utilizando o erro padrão.

Para avaliar se houve diferença estatísticas entre as doses testadas de extrato de urucum quanto à viabilidade celular, foi realizado o teste ANOVA de duas vias. Os ensaios foram

realizados de forma independente. Para isso, foram calculados intervalos de confiança de 95%. E o nível de significância para todos os testes foi de 5 % ($p < 0,05$). As doses testadas variaram de 2,5 a 80 $\mu\text{g/mL}$, para ambas as linhagens celulares. As análises estatísticas e a criação dos gráficos foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 8*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS DE SEMENTES DE URUCUM

O rendimento obtido para os extratos foi calculado de acordo com a equação “cálculo de rendimento” do Quadro 3 e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 1. O rendimento é a quantidade de extrato obtido da semente de urucum. É calculada a porcentagem de massa seca após as sementes passarem pelo processo de extração com solventes.

Após serem submetidas aos métodos de extração, com diferentes temperaturas e pressões, ocorre a extração de analitos e lipídeos de interesse [81], obtendo um material bruto com estes metabólicos de interesse, geralmente, obtém-se um volume de extrato menor do que o inicial. Considerando os 15 g de urucum inicial como 100%, a massa em gramas do extrato ao final do procedimento corresponde à porcentagem de rendimento.

Dentre os solventes e temperaturas testadas, o maior rendimento obtido foi com a extração utilizando Etanol na temperatura de 130°C, demonstrando 1,9 g de rendimento; correspondendo a 12,73%. O rendimento com a extração feita com o solvente Acetato de Etila a 130°C foi de 1,44 g, resultando em 9,57% de rendimento.

Os extratos com solvente de Acetato de Etila e Etanol, ambas extraídas na temperatura de 50°C, apresentaram rendimentos similares sendo de 1,12 e 1,11 g respectivamente, o que corresponde a 7,59% de rendimento para Acetato de Etila e de 7,69% para Etanol.

Já o extrato obtido com o solvente Hexano tanto na temperatura de 50°C quanto de 130°C apresentaram os menores rendimentos, com resultados praticamente iguais entre si, sendo de 5,27% de rendimento para ambas as temperaturas.

Visto que as sementes do urucum são compostas majoritariamente por carotenoides, biocompostos com potenciais terapêuticos, métodos tradicionais de extração de cor, como a maceração, consomem tempo e requerem grandes volumes de solventes. Existem hoje métodos avançados de extração de componentes ativos de plantas, tais como extração por ultrassom, extração com fluido supercrítico, extração enzimática e microextração líquido-líquido [82].

A extração acelerada com solvente (ASE) é feita em altas temperaturas (50 a 200°C) e pressões entre 10 e 15 Mpa, o que melhora a difusão do solvente e acelera o processo de extração [81]. Os resultados, apresentados na Tabela 1, mostraram que o solvente Etanol apresentou maior porcentagem de rendimento tanto para a temperatura de 130°C quanto para

50°C. No estudo feito por Quiroz [83], no qual avaliou-se o processo de extração de compostos bioativos de sementes de urucum, demonstrou-se que a maior concentração de etanol favorece a liberação de bixina devido ao aumento do teor de solvente e à formação de ligações de hidrogênio, pois compostos de polifenóis são extraídos com mais eficiência devido à sua polaridade [83].

Já no estudo feito por Alcázar-Alay (2017), mostrou que utilizando o método de fracionamento mecânico e extração com Etanol de baixa pressão, nas temperaturas de 40, 50 e 60°C, com 15 gramas de sementes, os rendimentos foram de 5% para 40 e 60°C e de 4% para a temperatura de 50°C [52], enquanto a extração por ASE, realizada neste trabalho a 50°C durante três minutos, rendeu 7,69%. Ou seja, obtivemos um rendimento 3,7% superior ao relatado por Alcázar-Alay (2017). Isso pode ser atribuído à alta pressão utilizada no equipamento de ASE, otimizando o processo.

Devido à predominância da bixina, representando aproximadamente 80% dos carotenoides presentes nas sementes de urucum, a extração utilizando etanol por meio da ASE demonstrou um rendimento superior em comparação aos solventes hexano e acetato de etila.

Tabela 1. Rendimento das amostras obtidas a partir da extração de biocompostos de sementes de urucum.

Amostra	Solvente	Temperatura	Rendimento Massa (g)	Rendimento (%)
H50	Hexano	50°C	0,82768	5,27
AC50	Acetato de Etila	50°C	1,12954	7,59
E50	Etanol	50°C	1,11579	7,69
H130	Hexano	130°C	0,76703	5,27
AC130	Acetato de Etila	130°C	1,44113	9,57
E130	Etanol	130°C	1,96714	12,73

Extratos por solventes Hexano a 50°C (H50), Acetato de Etila a 50°C (AC50), Etanol a 50°C (E50), Hexano a 130°C (H130), Acetato de Etila a 130°C (AC130), Etanol a 130°C (E130).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS E CORANTES DE URUCUM

5.2.1 Avaliação do rendimento dos extratos e corantes de urucum

Foi realizada a leitura de absorvância das seis amostras extraídas pelo método ASE-150 no comprimento de onda de 487 nm em espectrofotômetro (modelo LAMBDA XLS, L7110189) e os resultados estão representados na Figura 5.1. Todas as amostras foram diluídas em acetona, a qual foi utilizada como o branco na leitura no equipamento.

Visto que os carotenoides de interesse possuem a absorção na faixa de até 487 nm, o valor de absorbância para AC50 pode indicar maiores chances de se obter estes carotenoides em maior quantidade [83]. Foi determinado este comprimento de onda com base na literatura para identificação dos carotenoides bixina e norbixina [84]. Dentre todas as amostras analisadas, de extratos de semente de urucum e de amostras de corante de urucum da empresa New Max®, a amostra de extrato feita com o solvente Acetato de Etila a 50°C (AC50) apresentou o maior valor de absorbância na faixa de 487 nm, com absorbância de 2,247 nm.

Apesar do alto valor de absorbância, a amostra de Acetato de Etila a 50°C não foi a amostra que obteve o maior valor de rendimento (7,59%).

Seguida pelo segundo maior valor de absorbância, a amostra extraída pelo solvente etanol, apresentou um resultado de absorbância de 1,59 nm quando a 130°C e 0,682 nm com amostra extraída a 50°C utilizando o mesmo solvente. Isto demonstra que a temperatura influencia o rendimento de extração [84], [85].

Em relação aos rendimentos deste solvente, nas temperaturas de 130°C apresentou-se o maior rendimento (12,73%), e a 50°C obteve-se o terceiro melhor rendimento (7,69%) dentre as seis amostras. As absorbâncias para as amostras extraídas com Hexano sob 130 e 50°C não foram superiores a 0,3 nm e para Acetato de Etila a 130°C, apesar de ter apresentado um bom rendimento de (9,57%), demonstrou o menor valor de absorbância, sendo de 0,031 nm.

O valor baixo de absorbância na faixa de 487 nm pode indicar que a presença dos carotenoides bixina e norbixina, que apresentam absorção nesta faixa também seja baixa. Ou seja, existe a possibilidade de que teores de bixina e norbixina nesta amostra sejam menores que das demais amostras. Contudo, é necessário realizar uma análise de quantificação, visto que a análise de absorbância por espectrofotômetro é uma análise qualitativa.

Para as amostras dos corantes da empresa New Max, as três amostras (suspensão oleosa de urucum-bixina, corante natural de urucum em pó-norbixina e corante de extrato bruto de urucum em pó) apresentaram valores de absorbância inferiores aos das amostras extraídas pelos solventes Acetato de Etila a 50°C e Etanol a 50 e 130°C.

Em comparação às demais extrações por solventes (Hexano a 50 e 130°C, e Etanol a 50°C), as amostras de suspensão oleosa-bixina e corante natural de urucum-norbixina apresentaram valores muito semelhantes (Figura 5.1). Dentre as amostras de corante de urucum da empresa New Max®, o Corante de Extrato bruto de urucum apresentou o menor valor de

absorbância (0,086 nm). Todavia, apresentou um valor de absorbância superior somente a amostra extraída pelo solvente de Acetato de Etila a 130°C (0,031 nm).

Desta forma, a quantidade de teor de bixina e norbixina na amostra é importante, visto que está relacionada a suas atividades antimicrobianas [10], [46]. Nas análises de absorbância, a amostra de Etanol a 50°C teve um bom rendimento (7,69g) e um alto valor de absorbância (0,682 nm), superiores as amostras de Hexano 50°C e 130°C, que apresentaram valores de absorbância de 0,211 nm e 0,182 nm, respectivamente. Portanto, sugere-se a amostra de Etanol a 50°C e a 130°C, pois apresentaram maiores teores para os carotenoides e biocompostos com potencial atividade biológica e rendimento após a extração. Contudo, análises de porcentagem de bixina e norbixina, que são os carotenoides de interesse, foram realizadas para considerar a melhor amostra para os ensaios biológicos.

Tabela 2. Valores de absorbância dos extratos de semente de urucum e de corante natural de urucum da New Max.

Amostra	Valor da Absorbância
H50	0,211
H130	0,182
AC50	2,247
AC130	0,031
E50	0,682
E130	1,597
SO BIX	0,647
NRBX	0,249
EB	0,086

Extratos por solventes Hexano a 50°C (H50), Hexano a 130°C (H130), Acetato de Etila a 50°C (AC50), Acetato de Etila a 130°C (AC130), Etanol a 50°C (E50), Etanol a 130°C (E130), suspensão oleosa-bixina (SO BIX), corante natural de urucum-norbixina (NRBX) e corante de extrato bruto de urucum (EB).

5.2.2 Porcentagem do teor de bixina e norbixina nas amostras

Foram realizados os cálculos de porcentagem de teores de bixina e norbixina em todas as amostras, tanto das extrações por solventes quanto dos corantes de urucum da empresa New Max.

Para obtenção dos valores de porcentagem de bixina e norbixina foram utilizadas as equações apresentadas no Quadro 3. Estes cálculos baseiam-se no valor de absorbância no comprimento de onda de 487 nm, em que são encontrados os biocompostos bixina e norbixina [83]. Dessa forma, quanto maior o valor de absorbância neste comprimento de onda, maiores as chances de os compostos identificados serem carotenoides bixina e norbixina. Os resultados apresentados de porcentagem de bixina para todas as amostras encontram-se na Figura 5.2. Foi

observada diferença significativa entre as amostras. Ao realizar os testes, primeiramente com as amostras da empresa New Max (suspensão oleosa de bixina, extrato bruto de urucum – norbixina e extrato bruto de urucum), observou-se que os dados encontrados para bixina foram de 0,056%, 0,8% e 0,27% para suspensão oleosa, respectivamente. Na ficha técnica da empresa constavam porcentagens de 5,2%, 40% e 30% para teores de bixina [86]–[88], respectivamente para as mesmas amostras. Isso pode ter ocorrido devido ao processo de armazenamento. Alternativamente, deve-se buscar forma de análise mais sensível, como a cromatografia líquida de alta eficiência a fim de confirmar os teores de carotenoides.

Dentre todas as amostras, o Corante Natural de urucum em pó apresentou o maior teor para Bixina (0,8%) e o segundo maior para Norbixina (0,87%). Dentre as amostras de semente de urucum extraídas por solvente, o maior teor de bixina e norbixina foi identificado na amostra com o solvente Acetato de Etila a 50°C, representando um teor de 11,65% de bixina e o teor de 0,98% para norbixina. As amostras de extrato pelo solvente Hexano apresentaram as menores porcentagens de teores de bixina, com valores muito próximos a 1% (1,036% para 50°C e 0,825% para 130°C) e norbixina (0,093% para 50°C e 0,08% para 130°C), tornando essas amostras dispensadas para as futuras análises *in vitro*. É observado na Figura 5.2 e na Figura 5.3 que a porcentagem de bixina é superior à de norbixina em todas as amostras analisadas.

De início, foi utilizada a técnica de espectrofotometria para análise de teor de porcentagem de bixina e norbixina nas amostras. Contudo, o valor de absorbância de cada amostra (Tabela 2) utilizado no cálculo de porcentagem de teor do carotenoide pode representar qualquer outro composto que apresente absorção no comprimento de onda de 487 nm. Ou seja, outros compostos com o mesmo comprimento de onda da bixina e norbixina (até 478 nm) podem ter sido analisados.

Com isso, para confirmação da presença dos carotenoides de interesse no composto, foi necessário realizar uma análise mais sensível de identificação de compostos na amostra e que também permitisse a quantificação dos carotenoides como a CLAE. Assim, temos mais um método de confirmação que permite determinar com mais segurança, com base nos dados científicos, a confirmação da presença e quantificação dos biocompostos e assim realizar a análise de atividade biológica.

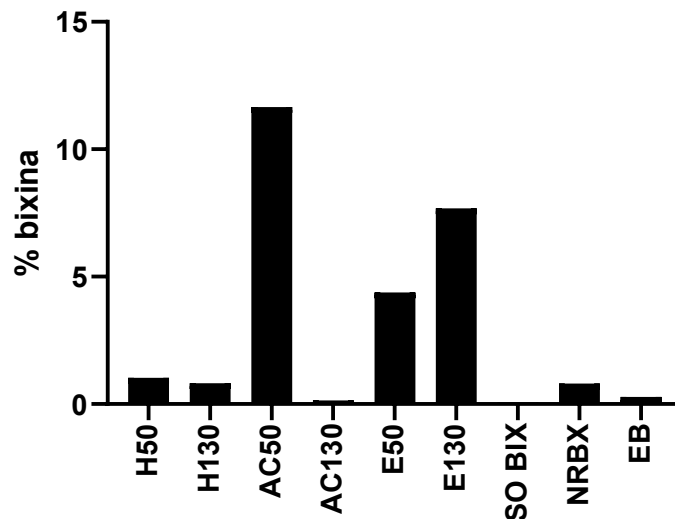


Figura 5.1. Análise de teor de bixina em amostras de sementes de urucum obtidas por extração com solvente e amostras de corantes de urucum. A análise foi realizada em espectrofotômetro e, com base na absorvância, foi calculada a porcentagem de teores de bixina em extratos e corantes de urucum. Extratos por solventes Hexano a 50°C (H50), Hexano a 130°C (H130), Acetato de Etila a 50°C (AC50), Acetato de Etila a 130°C (AC130), Etanol a 50°C (E50), Etanol a 130°C (E130), suspensão oleosa-bixina (SO BIX), corante natural de urucum- norbixina (NRBX) e corante de extrato bruto de urucum (EB).

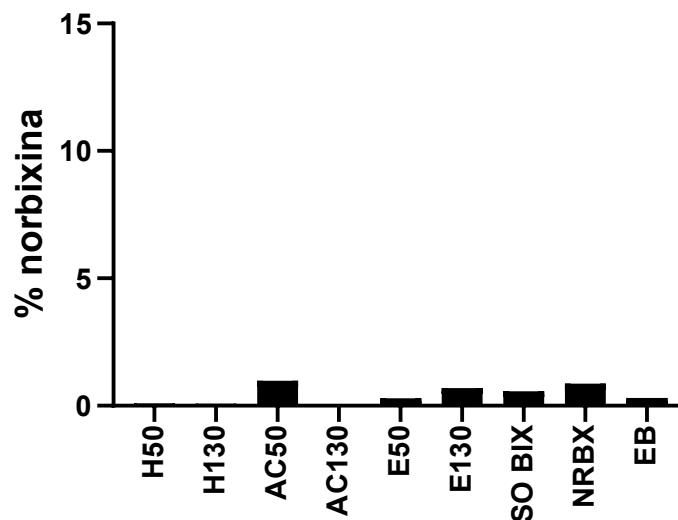


Figura 5.2. Análise de teor de norbixina em amostras de sementes de urucum obtidas por extração com solvente e amostras de corantes de urucum. A análise foi realizada em espectrofotômetro e, com base na absorvância, foi calculada a porcentagem de teores e norbixina em extratos e corantes de urucum. Extratos por solventes Hexano a 50°C (H50), Hexano a 130°C (H130), Acetato de Etila a 50°C (AC50), Acetato de Etila a 130°C (AC130), Etanol a 50°C (E50), Etanol a 130°C (E130), suspensão oleosa-bixina (SO BIX), corante natural de urucum- norbixina (NRBX) e corante de extrato bruto de urucum (EB).

5.2.3 Análise da composição das amostras de urucum por CLAE

Além da análise por espectrofotometria, foi realizada a análise de identificação e quantificação do carotenoide bixina das amostras de semente de urucum extraídas por solvente e das amostras de corante da empresa New Max®, por CLAE. As amostras de corante de urucum tiveram teores muito baixos de bixina. Os cromatogramas para essas amostras (corante natural de urucum-norbixina e corante de extrato bruto de urucum) não apresentaram tamanho de picos significativos comparados às amostras de sementes de urucum extraídas por solventes. Ao realizar a análise CLAE, os cromatogramas das amostras E130 e AC130, apresentaram os valores de área e porcentagem de área do pico ficaram acima da média, comparado às demais amostras, como apresentado na Figura 5.3, o que pode indicar que houve extração de outros componentes além de bixina.

A porcentagem da área do pico correspondente à porcentagem de bixina em relação ao extrato. A amostra AC50 apresentou um alto valor de porcentagem de área, de 67%, no comprimento de onda para detecção de bixina. Contudo, o tempo de retenção desta amostra (9,445 min) apresenta uma diferença de quase cinco minutos do padrão da bixina (Sigma > 97%), que é de 13,424 minutos.

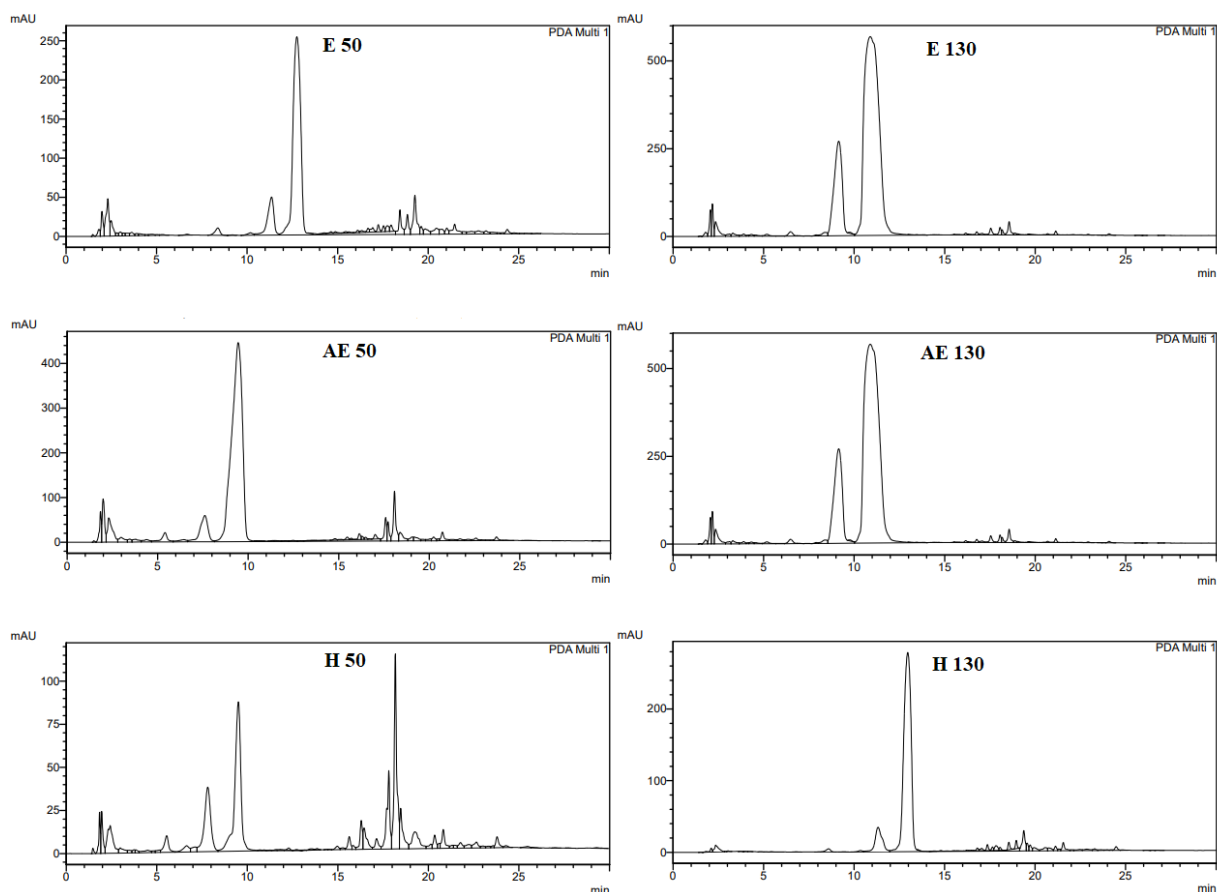


Figura 5.3. Picos dos cromatogramas da análise CLAE das amostras de semente de urucum. Extratos obtidos com uso de solventes Etanol a 50°C (E 50), Etanol a 130°C (E 130), Acetato de Etila a 50°C (AE 50), Acetato de Etila a 130°C (AE 130), Hexano a 50°C (H 50), Hexano a 130°C (H 130),

O tempo de retenção de um composto é uma das características consideradas na análise. A amostra E50 apresentou uma porcentagem de área 57%, o que representa 57% de bixina nessa amostra. Além disso o tempo de retenção (12,742 min) é o tempo mais próximo ao do padrão (Figura 5.5). Isso tornou essa amostra a candidata para as avaliações biológicas *in vitro*. Para as amostras extraídas com solvente hexano, em ambas as temperaturas foram obtidos os menores valores de porcentagem de bixina (porcentagem da área). No estudo realizado por Silva, o qual utilizou Etanol 98% para extração dos biocompostos, a análise por CLAE mostrou valores de 27,7g/100g de bixina e 1,08 g/100g de norbixina [66], ou seja 27% de bixina. Utilizando o método por ASE, a caracterização por CLAE identificou uma porcentagem de 57% para o solvente Etanol, confirmando efetividade e melhor desempenho pelo solvente e pela técnica.

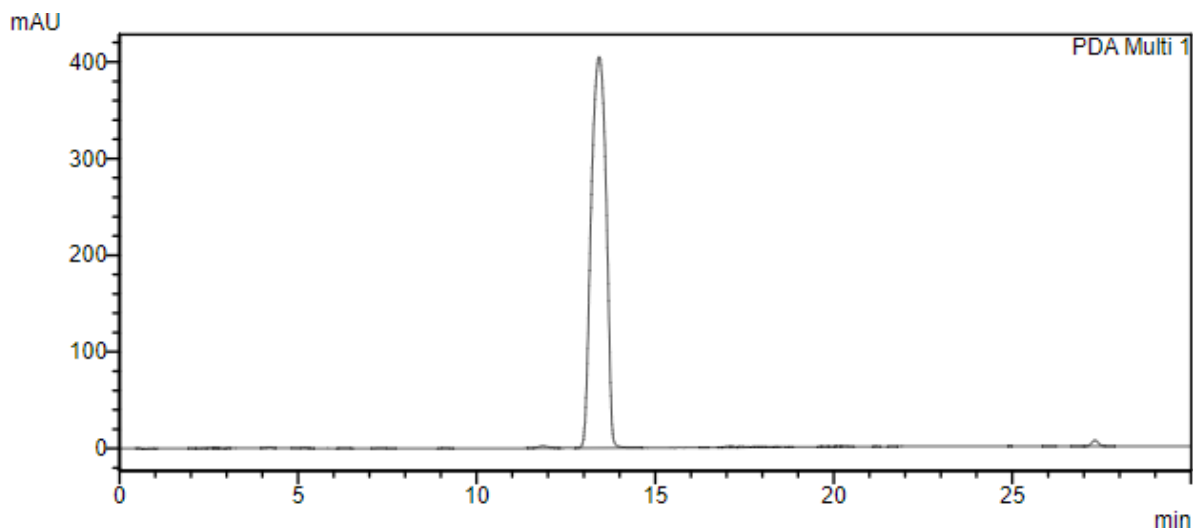


Figura 5.4. Picos dos cromatogramas da análise CLAE do padrão Bixina (Sigma > 95% de pureza).

Tabela 3. Valores de tempo de retenção, área, porcentagem da área e altura dos picos dos cromatogramas por análise CLAE das amostras de sementes de urucum. Valores de tempo de retenção, área, porcentagem da área e altura dos picos dos cromatogramas por análise CLAE das amostras de sementes de urucum.

Solvente	Tempo (min)	Área	% Área	Altura
E50	12.742	8136792	57.563	253301
E130	10.883	32436840	71.236	566569
AC50	9.445	19134655	67.085	20761
AC130	11.543	13781166	59.547	346048
Hexano 50 °C	18.169	1122773	14.824	113092
Hexano 130 °C	12.578	2878661	32.513	223262
Padrão Bixina (Sigma)	13.424	11729184	97.830	404963

Extratos obtidos com solventes Hexano a 50°C (H50), Hexano a 130°C (H130), Acetato de Etila a 50°C (AC50), Acetato de Etila a 130°C (AC130), Etanol a 50°C (E50), Etanol a 130°C (E130), Padrão sigma > 97% (Padrão).

Porcentagem da área do pico - CLAE

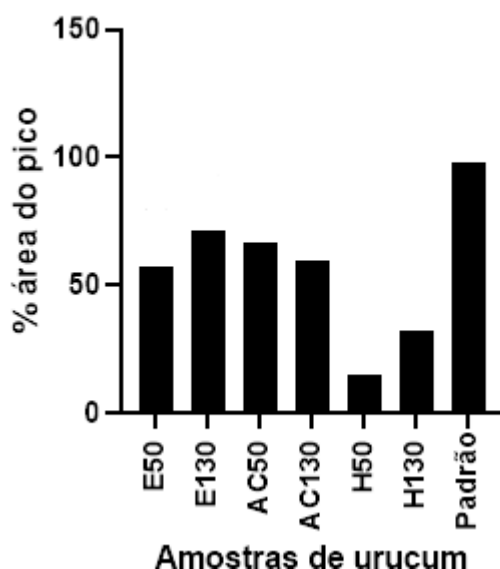


Figura 5.5. Valores da porcentagem da área do pico após a leitura das amostras no CLAE. Valores da porcentagem da área do pico após a leitura das amostras no CLAE. Extratos por solventes Hexano a 50°C (H50), Hexano a 130°C (H130), Acetato de Etila a 50°C (AC50), Acetato de Etila a 130°C (AC130), Etanol a 50°C (E50), Etanol a 130°C (E130), Padrão sigma > 95%

5.3 VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de viabilidade celular utilizando MTT (Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium) constitui na avaliação da taxa metabólica das células viáveis, permitindo a identificação de citotoxicidade/biocompatibilidade em cultura de células. Neste estudo utilizou-se este método para avaliação da biocompatibilidade do extrato de urucum e seleção de dose para realização dos demais ensaios biológicos. Nesse ensaio de viabilidade é avaliada a atividade enzimática mitocondrial, sendo a viabilidade celular calculada pela redução de sal MTT, que apresenta a cor amarelada, a cristais de Formazan, que apresenta coloração roxa [80]. Assim, quanto maior a formação de cristais de Formazan, ou seja, coloração roxa mais intensa, maior é a atividade enzimática mitocondrial, indicando maior viabilidade celular. A mensuração da formação destes cristais de Formazan é realizada em espectrofotômetro e a absorbância das amostras é diretamente proporcional à quantidade de cristais de Formazan e células viáveis.

Neste estudo, o ensaio de viabilidade celular foi realizado com linhagens de queratinócitos (HaCat) e fibroblastos de origem humana após tratamento com EU (diluído em DMSO ou etanol) em seis concentrações e em três tempos distintos. Realizou-se a avaliação dos dois solventes para identificar sua biocompatibilidade.

Os dados estão expressos na Figura 5.6 e Figura 5.7, e foram obtidos de três experimentos independentes para cada tratamento de 24, 48 e 72 horas. Para cada concentração, nos três tratamentos, foram realizadas triplicatas. Os valores das médias da viabilidade celular foram calculados em relação à média do controle (célula e meio DMEM). Os valores nos gráficos da Figura 5.10 e Figura 5.11 referem-se a média \pm erro padrão. O teste estatístico utilizado ANOVA e feito o teste Tukey, a fim de determinar se houve diferença estatística entre os grupos DMSO e ETOH.

No tratamento celular com a linhagem HaCat (Figura 5.6), não se observou diferença na viabilidade celular com EU diluído com DMSO e ETOH nos tratamentos nos três tempos analisados (24, 48 e 72 horas). Na linhagem de queratinócitos, após 24 horas de tratamento com 2,5 a 40 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de urucum, diluído em DMSO ou etanol, a viabilidade celular ficou acima de 80%, indicando que estas dosagens são adequadas para as demais avaliações dadas sua biocompatibilidade. Até a dose de 20 $\mu\text{g/mL}$ de EU, diluído em DMSO ou etanol, foi observada viabilidade de cerca de 80% após 48 ou 72 horas de tratamento. As concentrações de 5 a 10 $\mu\text{g/mL}$ para ambos os tratamentos apresentaram valores de viabilidade superiores a 80%. A concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ do tratamento de ETOH também se mostrou viável. Neste tratamento de 72 horas, a maior porcentagem de viabilidade em relação ao controle foi para o grupo do EU diluído em DMSO na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$, obtendo-se uma viabilidade de 111,7%.

Já nas análises para a linhagem de fibroblastos (Figura 5.7), a viabilidade celular por ensaio de MTT também não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com DMSO ou Etanol. Apenas as concentrações de 2,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de EU, tanto diluído em DMSO quanto em Etanol apresentaram a viabilidade celular superior a 80% para os tempos de 24 e 72 horas de tratamento. Já para o tratamento de 48 horas, o extrato de urucum se mostrou uma viabilidade acima de 80% para todas as concentrações, exceto para a de 80 $\mu\text{g/mL}$.

No estudo feito por Santos (2012), demonstrou-se que células de PC12 apenas nas concentrações de 0,05, 0,08 e 0,10 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram biocompatibilidade acima de 80% em 24 horas [89]. Já no estudo de Barcelos (2008), o qual utilizou corantes comerciais de extrato bruto de urucum, diluídos em DMSO, foi comprovada biocompatibilidade acima de 80% com células HepG2 para concentrações de 0,1 a 10 $\mu\text{g/mL}$, durante 24 horas [76]. Dessa forma, pode-se dizer que o extrato bruto de sementes de urucum, com teores de bixina e outras

substâncias ligadas a este biocomposto que também passaram pelo processo de extração, conferiram às células testadas biocompatibilidade até a concentração de 40µg/mL.

Estudos paralelos estão sendo realizados a fim de identificar uma dose de EU que induz atividade antimicrobiana e, ao mesmo tempo, que seja biocompatível, visto que o objetivo será empregar o EU posteriormente para tratamento de ferida infectada.

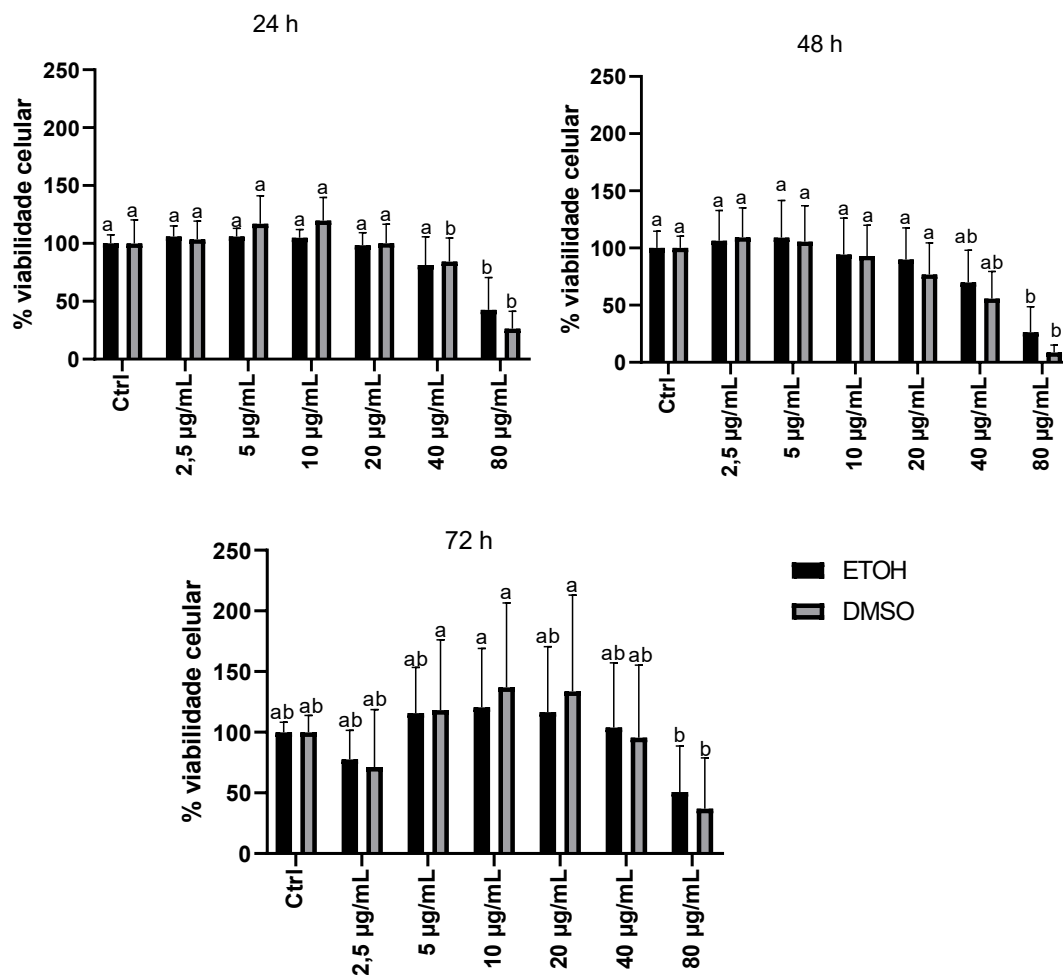


Figura 5.6. Viabilidade celular de queratinócitos (linhagem HaCat) após tratamento com extrato de urucum diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) ou etanol (ETOH), nas concentrações indicadas, por 24, 48 e 72 h. Os dados representam a Média ± Desvio Padrão. Foi realizado a ANOVA e teste Tukey ($p < 0,05$).

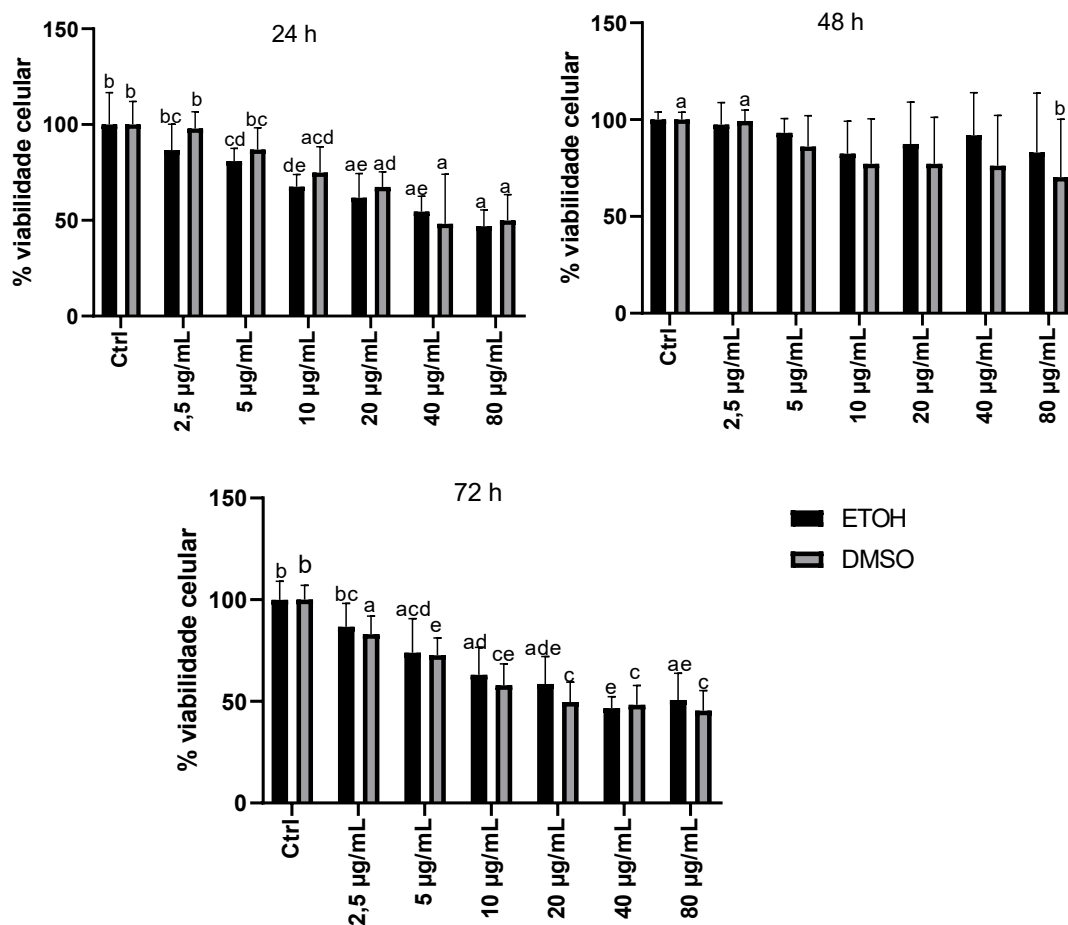


Figura 5.7. Viabilidade celular de fibroblastos após tratamento com extrato de urucum diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) ou etanol (ETOH) por 24, 48 e 72 h. Os dados representam a Média ± Erro Padrão. Foi realizado a ANOVA e teste Tukey ($p < 0,05$).

5.4 MIGRAÇÃO CELULAR

O ensaio de migração celular permite avaliarmos em determinados tempos o quanto as células analisadas, no caso, fibroblastos, necessitam para realizar o fechamento de uma ferida. As células de fibroblastos estão diretamente ligadas ao processo de cicatrização por ser células encontradas na epiderme.

Na Figura 5.8 estão os dados de porcentagem de redução da área do primeiro dia (zero hora) até o último dia de análise (72 horas). As células de fibroblastos que receberam somente meio essencial e 1% de DMSO foram utilizadas como controle e o tratamento recebeu extrato de semente de urucum diluído em DMSO na concentração de 10 µg/mL, com base nos resultados de citotoxicidade por MTT. Para o estudo, foram realizadas quatro réplicas para cada

controle e tratamento. A média e erro padrão foram calculados para cada grupo e os testes de ANOVA e Tukey foram utilizados para a verificação de diferenças estatísticas entre os grupos.

O tempo de zero hora é considerado como 100% e, com o decorrer dos dias, calculou-se a porcentagem de contração desta área. Entre todos os grupos não houve diferença estatística significativa entre os horários e os grupos. Em 24 horas, as células que receberam o extrato de urucum apresentaram uma porcentagem média de contração da área de 78,87%, comparada ao controle de somente células, com uma média de 96,86%. No tempo de 48 horas, o tratamento com urucum eleva sua média de porcentagem para 93,63%, um aumento de 26,5%. Já em 72 horas, o tratamento com extrato de urucum apresenta uma média de porcentagem de contração do ferimento de 99,37%, um fechamento praticamente completo.

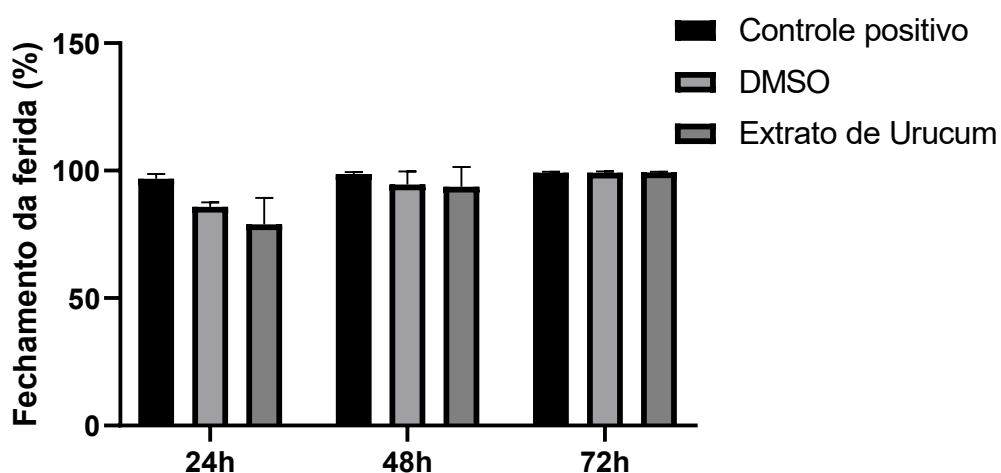


Figura 5.8. Ensaio de migração celular de fibroblastos após tratamento de somente cultura de célula, controle de células com DMSO (dimetilsulfóxido) 1% e com extrato de urucum por 24, 48 e 72 h. Os dados representam a Média \pm Erro Padrão.

Na Figura 5.9 é possível analisar a migração de células de fibroblastos durante o período de 72 horas até o fechamento quase completo da ranhura. Os resultados revelaram que a taxa de cicatrização da ferida foi determinada por meio da avaliação das áreas desprovidas de células da camada única celular após 24, 48 e 72 horas de exposição aos tratamentos. No estudo realizado por Chittasupho (2021), foi avaliada a porcentagem de fechamento da ferida em células de fibroblastos tratadas com curcuminóides (biocompostos extraído da curcumina) [90]. A dose utilizada foi de 7,5 μ g/mL e apresentou um fechamento de ferida de 21,37% após 24 horas de tratamento [90]. Comparado ao extrato de urucum no mesmo tempo, na dose de 10 μ g/mL, o percentual de fechamento foi de 78,87%. Apesar da pouca diferença na

concentração entre o extrato de urucum e os curcuminoides, o urucum apresentou fechamento 57,5% superior ao resultado do uso de curcuminoides. Este dado mostra a eficiência do extrato de urucum no processo de migração de fibroblastos diretamente relacionado ao processo de regeneração celular.

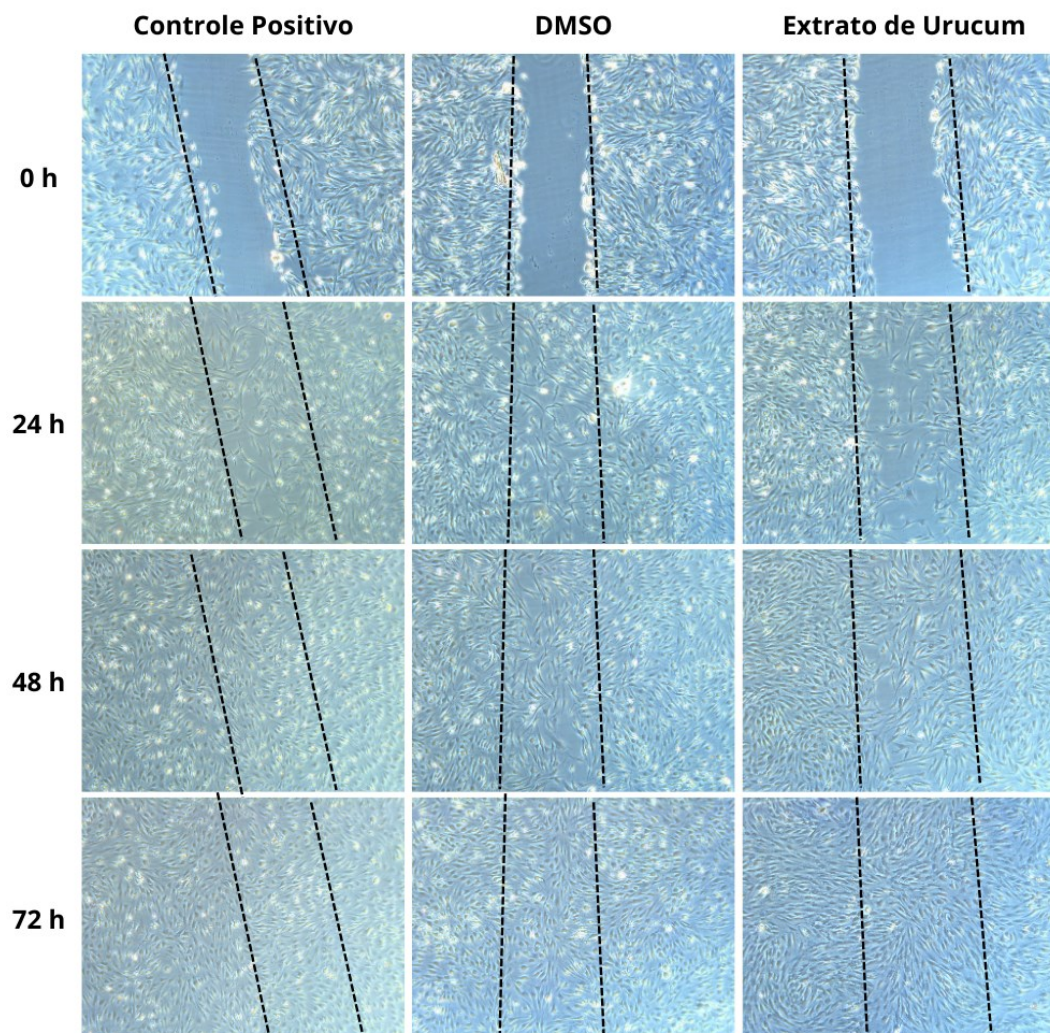


Figura 5.9. Imagens representativas de células Fibroblastos em um ensaio de ranhura. As imagens foram tiradas imediatamente após os arranhões e depois de 24, 48 e 72 horas.

5.5 ATIVIDADE POTENCIAL ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante é uma característica de suma importância na análise do extrato, visto que uma de suas futuras aplicações é na regeneração tecidual. A atividade antioxidante está ligada ao processo de inflamação, associada à aceleração da cicatrização de feridas.

Estudos utilizando a molécula de CMH em análise por RPE usam comumente concentrações de 0,2 mM [91], [92], 0,5 mM [93], [94] e até 1,0 mM [95]–[97]. No trabalho

feito por Gomes (2018), o qual utilizou 0,2 mM de CMH, os níveis de CM• variaram de 6 até 400 CM•mM [92]. A técnica por RPE permite a medição direta da concentração de radicais livres [98]. Enquanto no trabalho de Gomes foi utilizado apenas 0,2 mM de CMH, a concentração utilizada para o desenvolvimento deste trabalho foi de 10mM e nesta concentração os resultados não ultrapassaram a oxidação de 2,5 CM•mM (Figura 5.10). É dizer, na alta concentração de 10 mM de CMH, os resultados mostraram que as espécies reativas de oxigênio detectadas foram muito baixas. Além disso, considera-se que quanto maior a concentração, mais rápida é a auto-oxidação [99], o que não foi apresentado nas análises com extrato de urucum. Contudo, observou-se que, apesar de não haver diferença significativa na presença ou não de luz azul (450 nm), houve diferença significativa entre as amostras de EU diluídas em DMSO e Etanol na presença de luz azul, durante um minuto, como demonstrado na Figura 5.8. Isso pode indicar que o solvente Etanol com EU diluído promoveu uma maior captura da molécula CM. Ainda assim, a quantidade não é considerável para atividade antioxidante da amostra.

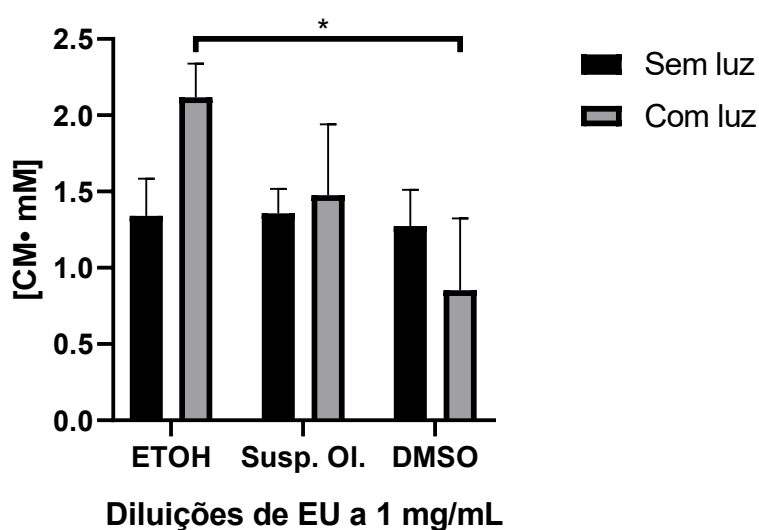


Figura 5.10. Análise quantitativa de ERO (espécies reativas de oxigênio) realizada através da medição da concentração de CM• (3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxil) em amostras de extrato de urucum diluída em etanol (ETOH), suspensão oleosa de bixina (Susp. Ol.) e DMSO. Dados representados como média \pm erro padrão da média. Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Tukey foi utilizado para comparar os três grupos em cada momento do tratamento.

Visto que a atividade antioxidante pela oxidação da molécula de CMH em contato com as amostras foi muito baixa, optou-se em realizar a avaliação potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH. É um ensaio colorimétrico, no qual ocorre uma oxirredução do DPPH em contato com a amostra, passando sua coloração de violeta para

amarela. A absorvância é identificada no comprimento de onda de 517 nm [77]. As análises foram realizadas em três experimentos independentes, com triplicatas para cada tratamento em cada réplica.

Para esta análise, foi determinado o uso do EU diluído em DMSO visto que este apresentou uma melhor diluição, confirmado pelo teste de MTT. Com base nos resultados, demonstrados na Figura 5.11, foi feita a análise das concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de EU e Ácido Ascórbico. Não houve diferença significativa entre as concentrações para os tratamentos do EU analisados. A média de porcentagem de ação antioxidante foi de 47,3% para a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ e de 48,22% para a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados demonstram que o EU diluído em DMSO apresentou atividade antioxidante com potencial de 50% durante 30 minutos. Estes resultados corroboram a literatura, como no estudo de Rossoni Júnior (2011), que mostrou que a concentração de 4000 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de urucum em contato com DPPH durante seis minutos resultou na neutralização do radical DPPH em torno de 50%. [100]. Em outro estudo utilizando DPPH e o composto isolado bixina na dose de 16 mg/mL, demonstrou-se que a amostra apresentou um potencial antioxidante de 54% no tempo de 25 minutos [101]. Estes dados mostram que independente do tempo de exposição ou da concentração, o extrato de urucum, como foi mostrado através dos resultados, apresenta um potencial antioxidante em torno de 50%.

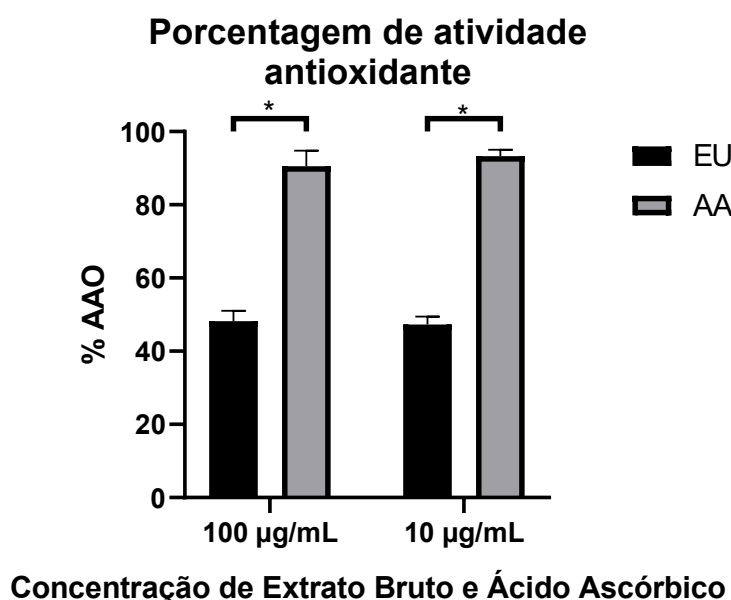


Figura 5.11. Análise da porcentagem de atividade antioxidante de amostras de extrato de urucum diluída em etanol DMSO. Dados representados como média \pm erro padrão da média. Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Tukey foi utilizado para comparar os dois grupos em cada momento do tratamento.

6 CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos de extração de biocompostos de interesse como os carotenoides bixina e norbixina mostraram-se eficientes, através das técnicas de caracterização por espectrofotometria e CLAE.

A amostra extraída por Etanol a 50°C apresentou rendimento (7,69 g) e teor de porcentagem de bixina (57,5%) considerados os mais adequados para realização das análises de atividade biológica, pois em relação aos demais extratos, apresentou o tempo de retenção de bixina pela técnica CLAE mais próxima ao padrão.

Observou-se viabilidade acima de 80% após tratamento de células HaCat (queratinócitos) e fibroblastos, em ambas as diluições com etanol e DMSO, com a exceção da concentração mais alta de 80 µg/mL. Desta forma, a concentração que apresentou maior índice de viabilidade celular (10 µg/mL) foi empregada para realização do ensaio de migração celular a fim de se avaliar o potencial de regeneração celular. Foram realizados dois ensaios para avaliação da atividade antioxidante do extrato de urucum puro. No primeiro ensaio com RPE, não foi possível averiguar atividade antioxidante, uma vez que os valores de oxidação da molécula de CMH foram muito baixos. Com isso, optou-se realizar o ensaio por DPPH. Neste teste, foi confirmado que em 30 minutos as concentrações de 10 e 100µg/mL de extrato apresentaram uma porcentagem de atividade antioxidante em torno de 50%, comparado ao controle (ácido ascórbico), que foi de 97%. As técnicas de extração e caracterização das sementes de urucum foram empregadas para analisar a presença das moléculas de bixina e norbixina de interesse. Em seguida, realizaram-se testes *in vitro* do extrato para determinar a concentração biologicamente não tóxica em culturas de queratinócitos e fibroblastos, células presentes na epiderme. Uma vez que a meta é incorporar esses compostos bioativos no curativo Rapha para o tratamento de úlceras diabéticas, os resultados indicaram que o composto é biocompatível e apresenta propriedades antioxidantes. Essas propriedades antioxidantes são particularmente relevantes, pois contribuem para a redução do processo inflamatório em feridas crônicas. Novos testes, como a avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante dos extratos de urucum, serão necessários para confirmar suas demais atividades terapêuticas e potenciais aplicações clínicas no futuro.

LISTA DE REFERÊNCIAS

- [1] M. Li, “Guidelines and standards for comprehensive clinical diagnosis and interventional treatment for diabetic foot in China (Issue 7.0),” *J. Interv. Med.*, vol. 4, no. 3, pp. 117–129, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.jimed.2021.07.003.
- [2] J. L. Burgess, W. A. Wyant, B. Abdo Abujamra, R. S. Kirsner, and I. Jozic, “Diabetic Wound-Healing Science,” *Medicina (B. Aires)*, vol. 57, no. 10, p. 1072, Oct. 2021, doi: 10.3390/medicina57101072.
- [3] BRASIL, “Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes,” 2021.
- [4] S. Ji *et al.*, “Consensus on the application of negative pressure wound therapy of diabetic foot wounds,” *Burn. Trauma*, vol. 9, Jan. 2021, doi: 10.1093/burnst/tkab018.
- [5] R. G. Frykberg, C. Attinger, L. Smeets, A. Koller, A. Bal, and V. Kavarthapu, “Surgical strategies for prevention of amputation of the diabetic foot,” *J. Clin. Orthop. Trauma*, vol. 17, pp. 99–105, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.jcot.2021.02.019.
- [6] T. Santana, “Análise da inflamação e estresse oxidativo no processo de cicatrização tecidual após o uso combinado de lipossomas com curcumina em biomembranas de látex natural e ledterapia para regeneração tecidual em portadores de úlcera,” Universidade de Brasília, 2021.
- [7] G. A. M. de A. Nunes, M. do C. dos Reis, M. F. F. Rosa, L. R. T. Peixoto, A. F. da Rocha, and S. de S. R. F. Rosa, “A system for treatment of diabetic foot ulcers using led irradiation and natural latex,” *Res. Biomed. Eng.*, vol. 32, no. 1, pp. 3–13, Feb. 2016, doi: 10.1590/2446-4740.0744.
- [8] F. de M. da Silva, “Desenvolvimento e aplicação de terapia baseada no uso de biomembranas a base de látex (*hevea brasiliensis*) contendo lipossoma com curcumina (*curcuma longa*) e papaína (*carica papaya*) e de ledterapia no tratamento de feridas em ratos wistar (*rattus norvegicus*),” 2020.

- [9] T. A. Espíndola, “Aprendizado de Máquina para automatização de classificação deregistros fotográficos de Úlcera de Pé Diabético UPD) conforme a Classificação da Universidade do Texas,” *Diss. Mestr. em Eng. Biomédica, Fac. UnB Gama, Programa Pós-Graduação em Eng. Biomédica.*, 2021.
- [10] D. Coelho dos Santos, A. da Silva Barboza, J. S. Ribeiro, S. A. Rodrigues Junior, Â. D. Campos, and R. G. Lund, “Bixa orellana L. (Achiote, Annatto) as an antimicrobial agent: A scoping review of its efficiency and technological prospecting,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 287, p. 114961, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.jep.2021.114961.
- [11] M. Bindschadler and J. L. McGrath, “Sheet migration by wounded monolayers as an emergent property of single-cell dynamics,” *J. Cell Sci.*, vol. 120, no. 5, pp. 876–884, Mar. 2007, doi: 10.1242/jcs.03395.
- [12] L. I. F. Moura, A. M. A. Dias, E. Carvalho, and H. C. de Sousa, “Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review,” *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 7, pp. 7093–7114, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.actbio.2013.03.033.
- [13] X. Huang *et al.*, “Hyperbaric oxygen potentiates diabetic wound healing by promoting fibroblast cell proliferation and endothelial cell angiogenesis,” *Life Sci.*, vol. 259, p. 118246, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.lfs.2020.118246.
- [14] S. J. Phang, B. Arumugam, U. R. Kuppusamy, M. B. Fauzi, and M. L. Looi, “A review of diabetic wound models—Novel insights into diabetic foot ulcer,” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 15, no. 12, pp. 1051–1068, Dec. 2021, doi: 10.1002/term.3246.
- [15] J. E. R. da Cruz, P. S. Ribeiro, F. Farisco, M. de S. Gomes, and E. R. Morais, “Composição de fenólicos, flavonoides, antocianinas, determinação da atividade antioxidante e comparação de métodos extrativos da folha e da casca de Caryocar brasiliense,” *Rev. Ciências Médicas e Biológicas*, vol. 21, no. 1, pp. 18–24, May 2022, doi: 10.9771/cmbio.v21i1.44970.
- [16] M. L. L. Gonçalves *et al.*, “Photodynamic therapy with Bixa orellana extract and LED

- for the reduction of halitosis: study protocol for a randomized, microbiological and clinical trial,” *Trials*, vol. 19, no. 1, p. 590, Dec. 2018, doi: 10.1186/s13063-018-2913-z.
- [17] M. da S. BRASIL, “Manual do Pé Diabético - Estratégias para o cuidado da Pessoa com Doença Crônica,” 2016.
- [18] N. C. Schaper, J. J. Van Netten, J. Apelqvist, S. A. Bus, R. J. Hinchliffe, and B. A. Lipsky, “Diretrizes do IWGDF sobre a prevenção e tratamento de pé diabético.” [Online]. Available: http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/geral/conce_inter_pediabetico.pdf
- [19] Grupo de Trabalho Interacional sobre o Pé diabético, “Consenso Internacional sobre Pé Diabético,” 2001.
- [20] M. L. Marcovecchio, M. Lucantoni, and F. Chiarelli, “Role of Chronic and Acute Hyperglycemia in the Development of Diabetes Complications,” *Diabetes Technol. Ther.*, vol. 13, no. 3, pp. 389–394, Mar. 2011, doi: 10.1089/dia.2010.0146.
- [21] L. Deng *et al.*, “The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Wound Healing,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2021, pp. 1–11, Feb. 2021, doi: 10.1155/2021/8852759.
- [22] Y. Taniyama and K. K. Griendling, “Reactive Oxygen Species in the Vasculature,” *Hypertension*, vol. 42, no. 6, pp. 1075–1081, Dec. 2003, doi: 10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F.
- [23] V. Falanga, “Wound healing and its impairment in the diabetic foot,” *Lancet*, vol. 366, no. 9498, pp. 1736–1743, Nov. 2005, doi: 10.1016/S0140-6736(05)67700-8.
- [24] D. Gan, International Diabetes Federation., and World Diabetes Foundation., *Diabetes atlas*. International Diabetes Federation, 2003.
- [25] BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE, “CADERNOS DE ATENÇÃO BÁSICA -

- Diabetes de Mellitus,” 2006.
- [26] M. da S. BRASIL, *Caderno de Atenção Primária*. 2011. [Online]. Available: www.saude.gov.br/dab
- [27] S. Dhivya, V. V. Padma, and E. Santhini, “Wound dressings – a review,” *BioMedicine*, vol. 5, no. 4, p. 22, Dec. 2015, doi: 10.7603/s40681-015-0022-9.
- [28] J. C. Dumville, S. O’Meara, S. Deshpande, and K. Speak, “Hydrogel dressings for healing diabetic foot ulcers,” *Cochrane Database Syst. Rev.*, Jul. 2013, doi: 10.1002/14651858.CD009101.pub3.
- [29] A. López-Delis *et al.*, “Characterization of the Cicatrization Process in Diabetic Foot Ulcers Based on the Production of Reactive Oxygen Species,” *J. Diabetes Res.*, vol. 2018, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1155/2018/4641364.
- [30] E. C. C. M. de Pinho, S. J. de F. e Sousa, F. Schaud, J.-J. Lachat, and J. Coutinho-Netto, “Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival,” *Arq. Bras. Oftalmol.*, vol. 67, no. 1, pp. 27–32, Feb. 2004, doi: 10.1590/S0004-27492004000100005.
- [31] M. Zimmermann *et al.*, “Teste de biocompatibilidade e resistência de membranas de látex em cães,” *Ciência Rural*, vol. 37, no. 6, pp. 1719–1723, Dec. 2007, doi: 10.1590/S0103-84782007000600033.
- [32] R. L. ROUSEFF, “High Performance Liquid Chromatographic Separation and Spectral Characterization of the Pigments in Turmeric and Annatto,” *J. Food Sci.*, vol. 53, no. 6, pp. 1823–1826, Nov. 1988, doi: 10.1111/j.1365-2621.1988.tb07851.x.
- [33] S. de S. R. F. Rosa *et al.*, “Evidence in Practice of Tissue Healing with Latex Biomembrane: Integrative Review,” *J. Diabetes Res.*, vol. 2019, pp. 1–17, Mar. 2019, doi: 10.1155/2019/7457295.
- [34] G. A. M. de A. Nunes, M. do C. dos Reis, M. F. F. Rosa, L. R. T. Peixoto, A. F. da

- Rocha, and S. de S. R. F. Rosa, “A system for treatment of diabetic foot ulcers using led irradiation and natural latex,” *Rev. Bras. Eng. Biomed.*, vol. 32, no. 1, pp. 3–13, 2016, doi: 10.1590/2446-4740.0744.
- [35] M. Vang Mouritzen and H. Jenssen, “Optimized Scratch Assay for *In Vitro* Testing of Cell Migration with an Automated Optical Camera,” *J. Vis. Exp.*, no. 138, Aug. 2018, doi: 10.3791/57691.
- [36] M. Piipponen, D. Li, and N. X. Landén, “The immune functions of keratinocytes in skin wound healing,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 22, pp. 1–26, 2020, doi: 10.3390/ijms21228790.
- [37] S. Werner, T. Krieg, and H. Smola, “Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 127, no. 5, pp. 998–1008, May 2007, doi: 10.1038/sj.jid.5700786.
- [38] S. I. Park *et al.*, “Therapeutic Effects of Acupuncture through Enhancement of Functional Angiogenesis and Granulogenesis in Rat Wound Healing,” *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, vol. 2012, pp. 1–10, 2012, doi: 10.1155/2012/464586.
- [39] M. A. Kisiel and A. S. Klar, “Isolation and Culture of Human Dermal Fibroblasts,” 2019, pp. 71–78. doi: 10.1007/978-1-4939-9473-1_6.
- [40] G. Giuliano, C. Rosati, and P. M. Bramley, “To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled,” *Trends Biotechnol.*, vol. 21, no. 12, pp. 513–516, Dec. 2003, doi: 10.1016/j.tibtech.2003.10.001.
- [41] Shahid-ul-Islam, L. J. Rather, and F. Mohammad, “Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications – A review,” *J. Adv. Res.*, vol. 7, no. 3, pp. 499–514, May 2016, doi: 10.1016/j.jare.2015.11.002.
- [42] D. de A. Vilar *et al.*, “Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review,” *Sci. World J.*, vol. 2014, pp. 1–11, 2014,

doi: 10.1155/2014/857292.

- [43] A. Z. Mercadante, A. Steck, D. Rodriguez-Amaya, H. Pfander, and G. Britton, "Isolation of methyl 9'Z-apo-6'-lycopenoate from *Bixa orellana*," *Phytochemistry*, vol. 41, no. 4, pp. 1201–1203, Mar. 1996, doi: 10.1016/0031-9422(95)00784-9.
- [44] D. Coelho Dos Santos, A. da Silva Barboza, J. S. Ribeiro, S. A. Rodrigues Junior, Â. D. Campos, and R. G. Lund, "Bixa orellana L. (Achiote, Annatto) as an antimicrobial agent: A scoping review of its efficiency and technological prospecting.," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 287, p. 114961, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.jep.2021.114961.
- [45] R. Rivera-Madrid, M. Aguilar-Espinosa, Y. Cárdenas-Conejo, and L. E. Garza-Caligaris, "Carotenoid Derivates in Achiote (*Bixa orellana*) Seeds: Synthesis and Health Promoting Properties," *Front. Plant Sci.*, vol. 7, Sep. 2016, doi: 10.3389/fpls.2016.01406.
- [46] A. Nasrollahzadeh, M. REZAZAD, A. almasi, M. moradi, and seyed mohamad ali ebrahimzade mousavi, "Evaluation of antimicrobial effect of Commercial Norbixin pigment (*Bixa orellana* L.) against pathogenic bacteria and food spoilage in vitro," *Food Sci. Technol.*, vol. 18, no. 119, pp. 133–142, Jan. 2022, doi: 10.52547/fsct.18.119.133.
- [47] R. Piva *et al.*, "Bixin Action in the Healing Process of Rats Mouth Wounds," *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 14, no. 9, 2014, doi: 10.2174/1389201014666131227111026.
- [48] S. O. Capella *et al.*, "Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental," *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.*, vol. 68, no. 1, pp. 104–112, Feb. 2016, doi: 10.1590/1678-4162-8374.
- [49] P. A. Moreira, J. Lins, G. Dequigiovanni, E. A. Veasey, and C. R. Clement, "The Domestication of Annatto (*Bixa orellana*) from *Bixa urucurana* in Amazonia," *Econ. Bot.*, vol. 69, no. 2, pp. 127–135, Jun. 2015, doi: 10.1007/s12231-015-9304-0.
- [50] T. Agudelo Patiño, J. A. Poveda-Giraldo, M. H. Salas Moreno, G. Rengifo Mosquera,

- and C. A. Cardona Alzate, “Potential for Sustainable Production of Natural Colorants in the Tropical Forest: A Biorefinery Case of Annatto Seeds,” *Sustain.*, vol. 15, no. 4, 2023, doi: 10.3390/su15043079.
- [51] Natividad LR and Rafael RR, “Carotenoid Analyses and Antibacterial Assay of Annatto (*Bixa orellana* L.), Carrot (*Daucus carota* L.), Corn (*Zea mays* L.) and Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Extracts,” 2014. [Online]. Available: www.isca.me
- [52] S. C. Alcázar-Alay, J. F. Osorio-Tobón, T. Forster-Carneiro, and M. A. A. Meireles, “Obtaining bixin from semi-defatted annatto seeds by a mechanical method and solvent extraction: Process integration and economic evaluation,” *Food Res. Int.*, vol. 99, pp. 393–402, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2017.05.032.
- [53] W. P. Jones and A. D. Kinghorn, “Extraction of Plant Secondary Metabolites,” 2012, pp. 341–366. doi: 10.1007/978-1-61779-624-1_13.
- [54] H. P. Borase *et al.*, “Plant Extract: A Promising Biomatrix for Ecofriendly, Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 173, no. 1, pp. 1–29, May 2014, doi: 10.1007/s12010-014-0831-4.
- [55] V. M. Dias, V. Pilla, L. P. Alves, H. P. M. Oliveira, and E. Munin, “Optical Characterization in Annatto and Commercial Colorific,” *J. Fluoresc.*, vol. 21, no. 1, pp. 415–421, Jan. 2011, doi: 10.1007/s10895-010-0730-1.
- [56] P. Roberto Nogueira Carvalho, M. DA Gomes Silva, E. Gomes Fabri, P. DA Eduardo Rocha Tavares, A. Lúcio Mello Martins, and L. Rodrigo Spatti, “CONCENTRAÇÃO DE BIXINA E LIPÍDIOS EM SEMENTES DE URUCUM DA COLEÇÃO DO INSTITUTO AGRONÔMICO (IAC) (1),” 2010.
- [57] FAO, J. Smith, and H. Wallin, “Annatto Extracts,” *67th JECFA - Chemical and Technical Assessment (CTA) 2006*, 2006.
- [58] D. R. Gómez-Linton, S. Alavez, A. Navarro-Ocaña, A. Román-Guerrero, L. Pinzón-López, and L. J. Pérez-Flores, “Achiote (*Bixa orellana*) Lipophilic Extract, Bixin, and

- δ -tocotrienol Effects on Lifespan and Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans*,” *Planta Med.*, vol. 87, no. 05, pp. 368–374, Apr. 2021, doi: 10.1055/a-1266-6674.
- [59] V. K. Koul, S. Koul, and C. L. Tikoo, “Process optimization for extraction and purification of Bixin from Annatto,” 2003.
- [60] S.-L. J. David, G.-C. C. Julián, V.-S. C. Liliana, A. A. Ayala-Aponte, and S.-C. Liliana, “Kinetics and bixine extraction time from achiote (*Bixa Orellana* L.),” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 59, no. 3, pp. 1239–1246, Mar. 2022, doi: 10.1007/s13197-021-05209-y.
- [61] W. Rahmalia, J.-F. Fabre, and Z. Mouloungui, “Effects of Cyclohexane/Acetone Ratio on Bixin Extraction Yield by Accelerated Solvent Extraction Method,” *Procedia Chem.*, vol. 14, pp. 455–464, 2015, doi: 10.1016/j.proche.2015.03.061.
- [62] S. F. Vieira *et al.*, “On the Bioactivity of *Echinacea purpurea* Extracts to Modulate the Production of Inflammatory Mediators,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 21, p. 13616, Nov. 2022, doi: 10.3390/ijms232113616.
- [63] S. Saha, S. Walia, A. Kundu, K. Sharma, and R. K. Paul, “Optimal extraction and fingerprinting of carotenoids by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry,” *Food Chem.*, vol. 177, pp. 369–375, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.039.
- [64] P. J. Worsfold, “SPECTROPHOTOMETRY | Overview,” in *Encyclopedia of Analytical Science*, Elsevier, 2005, pp. 318–321. doi: 10.1016/B0-12-369397-7/00714-7.
- [65] M. J. Scotter, S. A. Thorpe, S. L. Reynolds, L. A. Wilson, and P. R. Strutt, “Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection,” *Food Addit. Contam.*, vol. 11, no. 3, pp. 301–315, May 1994, doi: 10.1080/02652039409374229.
- [66] P. I. Silva, “Métodos de extração e caracterização de bixina e norbixina de sementes de

- urucum (*Bixa orellana* L.),” Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- [67] R. Lima, “Extração e Caracterização de Carotenoides e Compostos Fenólicos da Polpa e do Resíduo do Processamento da Goiaba (*Psidium guajava* L.),” Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2019.
- [68] M. Vogeser and C. Seger, “A decade of HPLC–MS/MS in the routine clinical laboratory — Goals for further developments,” *Clin. Biochem.*, vol. 41, no. 9, pp. 649–662, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2008.02.017.
- [69] R. G. de Oliveira Júnior *et al.*, “Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 125, pp. 549–561, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.fct.2019.02.013.
- [70] C. de C. Mantovani, “Uso da extração acelerada por solvente (ASE) para determinação cromatográfica de analitos de cocaína e tetraidrocannabinol em amostras de mecônio,” 2014.
- [71] M. DA Luiz Andrade Silva, “Extração de corantes de urucum (*Bixa orellana* L.) utilizando sistema de recirculação de solventes,” 2006.
- [72] A. P. González-Araúz *et al.*, “Antioxidant capacity assessment by abts of 9’z-bixin, 9’z-norbixin, 9’z-methylbixin and all emethylbixin from *bixa orellana* seeds,” *Rev. Boliv. Química*, vol. 39, no. 3, Aug. 2022, doi: 10.34098/2078-3949.39.3.3.
- [73] C. R. Afonso *et al.*, “Biodegradable antioxidant chitosan films useful as an anti-aging skin mask,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 132, pp. 1262–1273, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.052.
- [74] A. S. Queiroga, “Avaliação da atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre a inativação de espécies do gênero *Candida*: estudo in vitro,” 2010.
- [75] G. Karkada, G. A. Maiya, P. Arany, M. Rao, S. Adiga, and S. U. Kamath, “Effect of

- Photobiomodulation Therapy on Oxidative Stress Markers in Healing Dynamics of Diabetic Neuropathic Wounds in Wistar Rats,” *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 80, no. 1, pp. 151–160, Mar. 2022, doi: 10.1007/s12013-021-01021-9.
- [76] G. R. M. Barcelos, J. P. F. Angeli, J. M. Serpeloni, B. A. Rocha, M. S. Mantovani, and L. M. G. Antunes, “Effect of annatto on micronuclei induction by direct and indirect mutagens in HepG2 cells,” *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 50, no. 9, pp. 808–814, Dec. 2009, doi: 10.1002/em.20494.
- [77] S. Paulo, J. Pires, P. B. Torres, D. YAC dos Santos, and F. Chow, *Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas*. 2017.
- [78] BMM 5777 – Culturas celulares e suas aplicações em Microbiologia, “P3a - Contagem de células em câmara de Neubauer.”
- [79] B. Demczuk Jr and R. Hoffmann Ribani, “Updates on chemistry and use of annatto (Bixa orellana L.),” *Rev. Bras. Pesqui. em Aliment.*, vol. 6, no. 1, p. 37, Mar. 2015, doi: 10.14685/rebrapa.v6i1.144.
- [80] M. L. B. Carneiro, “Efeitos biológicos de citrato de ródio II livre e de sua associação a nanopartículas magnéticas e a magnetolipossomas em células de carcinoma mamário : estudos in vitro e in vivo,” 2011.
- [81] S. N. H. Mohammad Azmin, Z. Abdul Manan, S. R. Wan Alwi, L. S. Chua, A. A. Mustaffa, and N. A. Yunus, “Herbal Processing and Extraction Technologies,” *Sep. Purif. Rev.*, vol. 45, no. 4, pp. 305–320, Oct. 2016, doi: 10.1080/15422119.2016.1145395.
- [82] M. Yolmeh, M. B. Habibi Najafi, and R. Farhoosh, “Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM),” *Food Chem.*, vol. 155, pp. 319–324, Jul. 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.059.

- [83] J. Q. Quiroz, A. C. Torres, L. M. Ramirez, M. S. Garcia, G. C. Gomez, and J. Rojas, “Optimization of the Microwave-Assisted Extraction Process of Bioactive Compounds from Annatto Seeds (*Bixa orellana* L.),” *Antioxidants*, vol. 8, no. 2, p. 37, Feb. 2019, doi: 10.3390/antiox8020037.
- [84] R. W. Alves, “Extração de corantes de urucum por processos adsorptivos utilizando argilas comerciais e colloidal gas aphrons,” 2005.
- [85] F. V. Silva, “Síntese, caracterização e avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de óxido de níquel em culturas decélulas de fibroblastos e queratinócitos (linhagens NIH-3T3e HaCat),” 2016.
- [86] New Max, “Especificação Técnica 500425502XX Suspensão Oleosa Urucum Bixina 5% (4831 V).”
- [87] New Max, “FT 500421110XX / TECHNICAL SHEET Corante Natural de Urucum Hidrossolúvel Pó (Norbixina)(>40%)(4979).”
- [88] New Max, “FT 500421111XX / TECHNICAL SHEET Corante Natural de Urucum Hidrossolúvel Pó (Bixina) (>30%) (4980).”
- [89] G. C. dos Santos, L. M. Mendonça, G. A. Antonucci, A. C. dos Santos, L. M. G. Antunes, and M. de L. P. Bianchi, “Protective effect of bixin on cisplatin-induced genotoxicity in PC12 cells,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 50, no. 2, pp. 335–340, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.fct.2011.10.033.
- [90] C. Chittasupho, A. Manthaisong, S. Okonogi, S. Tadtong, and W. Samee, “Effects of Quercetin and Curcumin Combination on Antibacterial, Antioxidant, In Vitro Wound Healing and Migration of Human Dermal Fibroblast Cells,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 1, p. 142, Dec. 2021, doi: 10.3390/ijms23010142.
- [91] K. Berg, M. Ericsson, M. Lindgren, and H. Gustafsson, “A High Precision Method for Quantitative Measurements of Reactive Oxygen Species in Frozen Biopsies,” *PLoS One*, vol. 9, no. 3, p. e90964, Mar. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0090964.

- [92] B. R. B. Gomes *et al.*, “Increase of reactive oxygen species in different tissues during lipopolysaccharide-induced fever and antipyresis: an electron paramagnetic resonance study,” *Free Radic. Res.*, vol. 52, no. 3, pp. 351–361, Mar. 2018, doi: 10.1080/10715762.2018.1425549.
- [93] S. Scheinok, P. Leveque, P. Sonveaux, B. Driesschaert, and B. Gallez, “Comparison of different methods for measuring the superoxide radical by EPR spectroscopy in buffer, cell lysates and cells,” *Free Radic. Res.*, vol. 52, no. 10, pp. 1182–1196, Oct. 2018, doi: 10.1080/10715762.2018.1541321.
- [94] S. I. Dikalov, I. A. Kirilyuk, M. Voinov, and I. A. Grigor’ev, “EPR detection of cellular and mitochondrial superoxide using cyclic hydroxylamines,” *Free Radic. Res.*, vol. 45, no. 4, pp. 417–430, Apr. 2011, doi: 10.3109/10715762.2010.540242.
- [95] A. Martin-Garrido *et al.*, “NADPH oxidase 4 mediates TGF- β -induced smooth muscle α -actin via p38MAPK and serum response factor,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 50, no. 2, pp. 354–362, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.007.
- [96] S. Dikalov, M. Skatchkov, B. Fink, and E. Bassenge, “Quantification of Superoxide Radicals and Peroxynitrite in Vascular Cells Using Oxidation of Sterically Hindered Hydroxylamines and Electron Spin Resonance,” *Nitric Oxide*, vol. 1, no. 5, pp. 423–431, Oct. 1997, doi: 10.1006/niox.1997.0139.
- [97] N. Weissmann *et al.*, “Detection of reactive oxygen species in isolated, perfused lungs by electron spin resonance spectroscopy,” *Respir. Res.*, vol. 6, no. 1, p. 86, Dec. 2005, doi: 10.1186/1465-9921-6-86.
- [98] R. P. Barroso, L. S. Berlim, A. S. Ito, and A. J. Costa-Filho, “In vitro antioxidant properties of golden grass (*Syngonanthus nitens*) by electron paramagnetic resonance,” *Food Sci. Nutr.*, vol. 7, no. 4, pp. 1353–1360, Apr. 2019, doi: 10.1002/fsn3.969.
- [99] J. P. Gotham, R. Li, T. E. Tipple, J. R. Lancaster, T. Liu, and Q. Li, “Quantitation of spin probe-detectable oxidants in cells using electron paramagnetic resonance

spectroscopy: To probe or to trap?," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 154, pp. 84–94, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.020.

- [100] J. V. Rossoni Júnior, "Extrato de Urucum e β -caroteno alteram a sinalização redox em neutrófilos de ratas diabéticas através da regulação da expressão gênica da NADPH oxidase, superóxido dismutase e catalase," 2011.
- [101] F. K. F. dos Santos, "Santos, Filipe Kayodê Felisberto dos Determinação dos teores de bixina e análise da atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos das sementes de duas variedades de urucum (Bixa orellana l.) em diferentes temperaturas de estocagem," Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 2013.