

II SOUTHERN SCIENCE CONFERENCE

2024 - VIRTUAL CONFERENCE AND IN PERSON EDITION

EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF BIXIN (*BIXA ORELLANA* L.): CLINICAL IMPACT AND ITS PHARMACOLOGICAL APPLICATIONS

LIMA, Sara da Silva^{1*}; SILVA, Francico Mayron de Sousa e²; VIANA, Vicente Galber³; CARVALHO, Luiz Fernando Meneses⁴; NUNES, Livio Cesar Cunha⁵

^{1,5} Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia

^{2,5} Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF-UFPI)

^{2,3,4} Instituto Federal do Piauí, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Materiais (PPGEM-IFPI)

* Correspondence author
e-mail: sara.lima@ufpi.edu.br

RESUMO

The annatto plant (*Bixa orellana* L.), from the Bixaceae family, is widely recognized as the source of the most used natural dye in the world. The extracts obtained from its fruits can be water-soluble or fat-soluble, positioning annatto as one of the main natural products for the food industry, besides its applications in pharmacology, cosmetics, and technology. Carotenoids extracted from annatto are vulnerable to degradation when exposed to light, high temperatures, or sulfur dioxide. This degradation can compromise the effectiveness of carotenoids, which demonstrate significant potential in clinical treatments. Bixin, one of the main compounds extracted from annatto seeds, can contribute to reducing cholesterol levels, preventing cardiovascular diseases, decreasing inflammation in lung injuries, influencing motor activity in mice, and inhibiting gastric secretion without impacting acid production. Additionally, bixin presents antispasmodic and hypotensive properties, potentially improving health and well-being, especially when applied in biomedical devices. The analysis of bixin by UV-visible spectroscopy, in the range of 200 to 900 nm, using chloroform as a solvent, indicated that the peaks observed in the spectrum vary according to the solvent used. Infrared spectroscopy revealed a band between 772.4 and 778.8 cm⁻¹, associated with hydrogen vibration of a cis-C-CH=CH-C structure, with a strong peak at 754 cm⁻¹. The presence of a peak at 1159 cm⁻¹ strongly suggests the cis structure of bixin. Future studies are fundamental to deepen the understanding of how these characteristics influence the efficacy and safety of bixin in specific applications.

Keywords: Annatto plant, Bixin extract, Carotenoids, Spectroscopic analysis, Pharmaceutical applications.

PRABHAKARA RAO; RAO, 2003).

1. INTRODUÇÃO:

A planta urucum (*Bixa orellana* L.), da família Bixáceas, é exclusivamente reconhecida pela restrição de um corante natural, a bixina, que possui aplicações específicas nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (OZAKI; DUARTE, 2006; ZARRINGHALAMI; SAHARI; HAMIDI-ESFEHANI, 2009). Este corante é extraído dos frutos da planta e pode resultar em produtos hidrossolúveis e lipossolúveis, destacando-se como um dos principais carotenoides, com 80% de sua composição formada por carotenoides identificados (SATYANARAYANA;

A bixina é aprovada pela FDA para uso na indústria alimentícia e cosmética, apresentando características lipossolúveis devido à presença de éster metílico em sua estrutura (GARCIA *et al.*, 2012). Além disso, a bixina é estável na presença de agentes redutores e oxidantes, o que a torna útil em diversas formulações. Em termos de atividade farmacológica, a bixina possui propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antitumorais (COSTA; CHAVES, 2005).

Estudos demonstram seus efeitos anti-inflamatórios, genotóxicos e hepatoprotetores. A planta também apresenta potencial no tratamento

da asma brônquica e na modulação de comportamentos relacionados ao diabetes. Contudo, sua baixa solubilidade em água limita seu uso, incentivando pesquisas em técnicas de encapsulamento para melhorar sua eficácia como biomaterial (RIOS; MERCADANTE, 2004).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Cloroformio UV HPLC - Espectroscópico 1000ml – Dinâmica®; Hexano PA 1000ml - Dinâmica®; Acetonitrila HPLC (Gradiente) 4000ml - PANREAC®; Ácido Acético Glacial PA ACS 1000ml - VETEC®.

2.2 Métodos

A bixina, uma matéria-prima extraída das sementes do urucum (*Bixa orellana* L.), foi obtida no município de Agricolândia – PI, região nordeste do Brasil (Latitude: 5° 48' 1" Sul, Longitude: 42° 40' 6" Oeste), seguindo um procedimento adaptado ao método proposto (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1998). Aproximadamente 200 g de sementes de urucum, previamente limpas de folhas e cascas, foram colocadas em um extrator Soxhlet com 1000 mL de hexano (C_6H_{14}) sob agitação constante por 24 horas. Após esse período, o hexano foi removido e, em seguida, adicionou-se clorofórmio ($CHCl_3$) a 70°C durante mais 24 horas. O precipitado resultante foi filtrado e seco em estufa a 60 °C por 24 horas (figura 1).

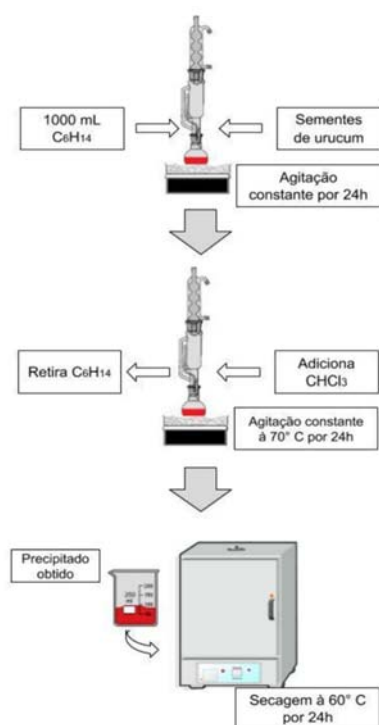


Figura 1. Fluxograma da síntese da Bixina.

Para caracterizar a amostra de bixina, diversos métodos foram aplicados. A análise por espectroscopia UV-Visível foi realizada em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800, cobrindo a faixa de 200 a 900 nm, utilizando $CHCl_3$ como solvente para diluição da bixina. A morfologia da bixina foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com um equipamento modelo SSX-550 da Shimadzu. A amostra foi submetida à secagem a 60 °C por 24 horas e coberta com uma fina camada de ouro para garantir condutividade, sendo a análise realizada com uma tensão de 15 kV.

A composição química foi determinada por Fluorescência de Raios-X (FRX) de energia dispersiva, utilizando um espectrômetro Epsilon 30 da Panalytical, empregando um método semiquantitativo em atmosfera de vácuo. O difratograma da amostra foi obtido através da técnica de Difração de Raios-X (DRX), utilizando um difratômetro Shimadzu XRD-6000 com radiação $CuK\alpha$ (40 kV e 30 mA), sendo o intervalo de varredura entre 10° e 90° com uma taxa de 0,014 °/min.

As mudanças estruturais e funcionais na amostra foram avaliadas por Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) com um espectrômetro Shimadzu IRA Ftnity-1, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} . A estabilidade térmica foi investigada por Análise Termogravimétrica (TGA) no modelo Shimadzu TGA-51, abrangendo uma faixa de temperatura de 25 °C a 1000 °C, enquanto a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi conduzida com o modelo DSC 60 PLUS da Shimadzu, entre 25 °C e 600 °C.

Para a separação cromatográfica da bixina, foi utilizada a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com uma coluna Lichrospher 100 RP-18. A fase móvel foi composta de acetonitrila e ácido acético (75:25). As amostras foram previamente filtradas e injetadas em um cromatógrafo LC-10 AD VP da Shimadzu, com detecção em 460 nm por UV-visível. A identificação dos picos de bixina foi baseada tanto no comportamento cromatográfico quanto na comparação dos espectros obtidos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A análise por espectrofotometria UV/Visível revelou picos em 470 e 502 nm, em concordância com os resultados experimentais obtidos (figura 2). Esses picos de absorção da bixina podem variar de acordo com o solvente

empregado, e, neste estudo, o clorofórmio foi utilizado, resultando em um pico mais intenso em 470 nm (SCOTTER, 2016).

A bixina diluída em clorofórmio apresenta picos próximos, em 471 nm e 503 nm (RAHMALIA; FABRE; MOULOINGUI, 2015), que explica que as duplas ligações conjugadas da bixina formam um grupo cromóforo responsável por absorver luz, resultando em uma forte banda de absorção acima de 400 nm, como também foi observado nesta análise.

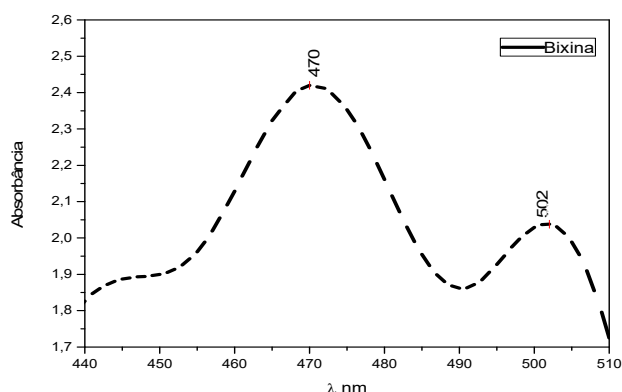


Figura 2. Espectro UV-vis da Bixina diluída em CHCl_3 .

Na análise por MEV, após a deposição de uma fina camada de ouro de 14 nm para aumentar a condutividade e facilitar a visualização, foi identificada a presença de cristais de bixina cercados por aglomerados de impurezas, como mostrado na figura 3. Esses aglomerados podem ser consequência do processamento e manipulação durante a restrição do material.

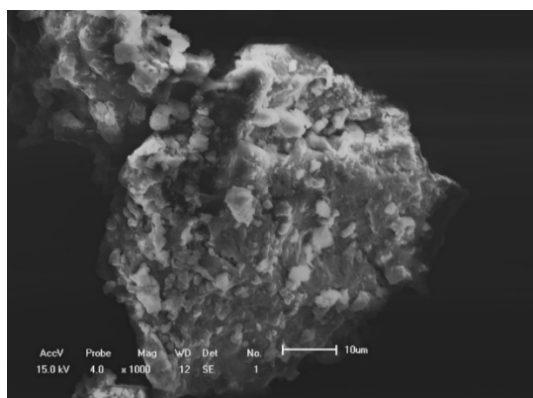


Figura 3. Micrografia da Bixina.

A FTIR da bixina revelou uma forte banda em 1159 cm^{-1} , característica de um grupo éster CO típico de espécies cis. Além disso, uma banda entre $772,4$ e $778,8\text{ cm}^{-1}$ foi associada à vibração de hidrogênio fora do plano do grupo cis- $\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}$, com um pico forte em 754 cm^{-1} , indicando a presença da estrutura cis na bixina (figura 4). Quando protegida em clorofórmio,

observou-se uma banda larga em 3349 cm^{-1} , atribuída à vibração de alongamento dos grupos OH, além de uma banda em 1716 cm^{-1} referente ao grupo $\text{C}=\text{O}$. Outras bandas incluíram vibrações de CO entre 1285 e 1159 cm^{-1} , e vibrações de $\text{C}=\text{C}$ em 1610 cm^{-1} , dados que estão de acordo com a literatura científica disponível (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1998; YUSÁ-MARCO *et al.*, 2008; OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2019).

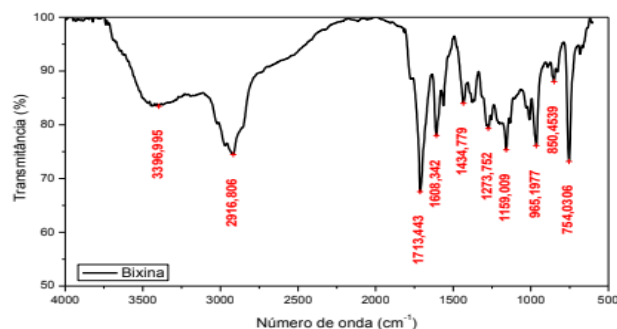


Figura 4. Espectroscopia de infravermelho da Bixina.

Na análise da TG e DSC, a curva TG da bixina, realizada sob atmosfera de nitrogênio, mostrou perda de massa em diferentes faixas de temperatura. A primeira perda, de 2,35%, ocorreu entre $20-120\text{ °C}$ devido à umidade, seguida por uma perda de 9,02% entre $120-200\text{ °C}$, e uma perda significativa de 38,41% entre $200-400\text{ °C}$. A isomerização da cis-bixina para trans ocorre entre $200-240\text{ °C}$, com fusão observada por volta de 200 °C .

A análise DSC confirmou eventos endotérmicos e exotérmicos, com um pico endotérmico entre $142,59$ e $196,52\text{ °C}$, atribuído à fusão da bixina, corroborando os dados da TG. Eventos térmicos adicionais entre $348,03-384,54\text{ °C}$ e $450,45-505,37\text{ °C}$ foram relacionados à manipulação térmica da bixina.

A cromatografia líquida de alta eficiência foi validada para a análise, uma vez que não apresentou picos de interferência significativos (figura 5), conforme descrito no estudo de (SILVA *et al.*, 2005) Esse método foi utilizado para purificar, identificar e quantificar os pigmentos de urucum por técnicas espectroscópicas e cromatográficas. Nos cromatogramas, foram observados picos minoritários com tempos de retenção próximos ao da bixina ($19,792\text{ min}$), sugerindo a presença de isômeros geométricos.

4. CONCLUSÃO:

Os resultados indicam que a bixina é uma promessa de biomaterial para a indústria

farmacêutica, devido à sua estrutura bem definida, estabilidade térmica em temperaturas moderadas e composição química conhecida. No entanto, a presença de isômeros e a manipulação em temperaturas mais baixas podem ser especificações que precisam ser comprovadas antes de sua utilização em produtos farmacêuticos. Estudos adicionais são essenciais para entender como essas características influenciam a eficácia e a segurança da bixina em aplicações específicas.

5. DECLARAÇÕES

5.1. Agradecimentos

Agradecimento à CAPES. Ao IFPI, UFPI e ao Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo – Medicamentos e Correlatos.

5.2. Acesso Aberto

Este artigo está licenciado sob uma Licença Internacional Creative Commons Attribution 4.0 (CC BY 4.0), que permite o uso, compartilhamento, adaptação, distribuição e reprodução em qualquer meio ou formato, desde que seja dado o devido crédito ao(s) autor(es) original(is) e à fonte, seja fornecido um link para a licença Creative Commons e seja indicado se foram feitas alterações. As imagens ou outros materiais de terceiros neste artigo estão incluídos na licença Creative Commons do artigo, a menos que indicado de outra forma em uma linha de crédito para o material. Se o material não estiver incluído na licença Creative Commons do artigo, e o uso pretendido não for permitido por regulamentação estatutária ou exceder o uso permitido, você precisará obter permissão diretamente do detentor dos direitos autorais. Para ver uma cópia desta licença, visite <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

6. REFERÊNCIAS:

- BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Teor de bixina em quatro variedades de *Bixa orellana* L. cultivadas na Paraíba. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 7-8, n. 1, p. 41–47, 1998. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x1998000100005>
- COSTA, C. L. S. DA; CHAVES, M. H. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 149–152, fev. 2005. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422005000100026>
- GARCIA, C. E. R. et al. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1510–1517, ago. 2012. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782012000800029>
- OLIVEIRA JÚNIOR, R. G. et al. Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 549–561, mar. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.013>
- OZAKI, A. T.; DUARTE, P. DA C. Fitoterápicos utilizados na medicina veterinária, em cães e gatos. **Infarma**, v. 18, n. 1, 2006. <https://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/11/infarma06.pdf>
- RAHMALIA, W.; FABRE, J.-F.; MOULOUGUI, Z. Effects of Cyclohexane/Acetone Ratio on Bixin Extraction Yield by Accelerated Solvent Extraction Method. **Procedia Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 455–464, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.061>
- RIOS, A. de O.; MERCADANTE, A. Z. Otimização das condições para obtenção de padrão de bixina e das etapas de extração e saponificação para quantificação de bixina. **Alim. Nutr.**, v. 15, p. 12, 2004. <https://www.scielo.br/j/cagro/a/vw53fm5dCYbBp9pDT RgtWnh/?format=pdf&lang=pt>
- SATYANARAYANA, A.; PRABHAKARA RAO, P. G.; RAO, D. G. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). - ePrints@CFTRI. **Cftri.res.in**, v. 40, n. 2, 2024.
- SCOTTER, M. The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 26, n. 8, p. 1123–1145, ago. 2009. <https://doi.org/10.1080/02652030902942873>
- SILVA, M. C. D. et al. Thermogravimetric investigations on the thermal degradation of bixin, derived from the seeds of annatto (*Bixa orellana* L.). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 79, n. 2, p. 277–281, 1 jan. 2005. <https://doi.org/10.1007/s10973-005-0049-3>
- YUSÁ-MARCO, D. J. et al. Characterization of colouring compounds in annatto (*Bixa orellana* L.) Used in historic textiles by means of UV-vis spectrophotometry and FTIR spectroscopy. **Publicación del instituto universitario de restauración del patrimonio de la UPV**, v. 3, 2008. https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/31763/2008_03_153_158.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- ZARRINGHALAMI, S.; SAHARI, M. A.; HAMIDI-ESFEHANI, Z. Partial replacement of nitrite by annatto as a colour additive in sausage. **Meat Science**, v. 81, n. 1, p. 281–284, jan. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.08.003>

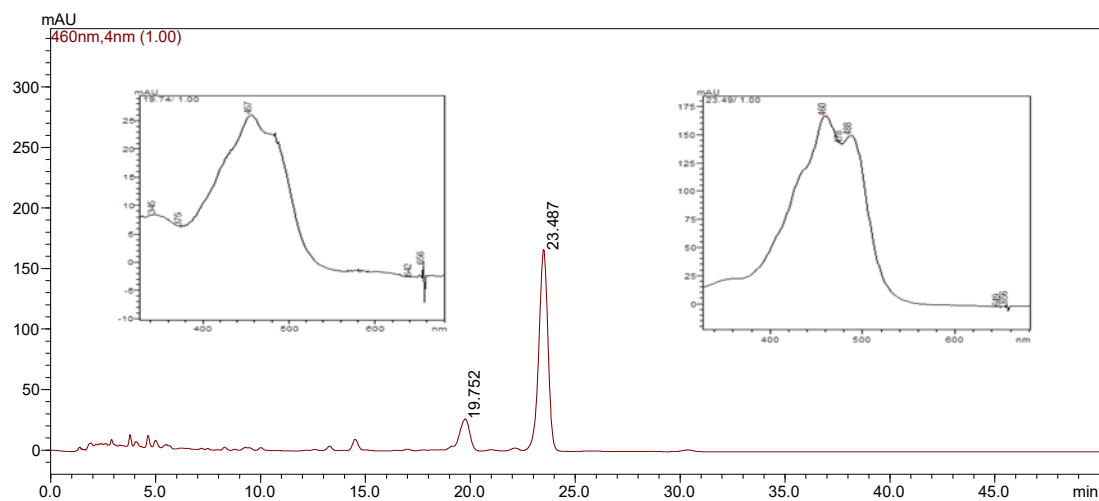


Figura 5. Cromatograma, obtido por CLAE, do padrão de bixina. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.