

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Bixa orellana L.

Mónica Maria Orfão Vieira

Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho elaborado sob a orientação da
Professora Doutora Maria da Graça Costa Miguel

2018



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Bixa orellana L.

Mónica Maria Orfão Vieira

Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho elaborado sob a orientação da
Professora Doutora Maria da Graça Costa Miguel

2018

Bixa orellana L.

Declaração de autoria de trabalho

Sendo totalmente original e único, declaro que sou a autora deste trabalho. Todos os trabalhos que foram consultados estão devidamente citados no texto e na lista de referências incluídas no fim.

© Mónica Maria Orfão Vieira

“A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.”

“Life is like riding
a bicycle. To keep your balance, you must keep moving”.

Albert Einstein

Agradecimentos

Ao longo de todos estes anos, existiram fases de maior pressão, mas o término deste processo de formação é um contentamento para mim e para quem sempre me apoiou e me deu força para continuar. Esta é uma altura em que posso agradecer a todos os que fizeram parte desta caminhada.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a todos os professores que me acolheram no meu processo de mudança, quando vim da Universidade do Porto para o Algarve. Para além do excelente trabalho que desenvolveram como docentes, também me ajudaram muito na integração. Destaco de forma especial a Professora Custódia Fonseca e a Professora Maria Graça Miguel por me terem ajudado nesta fase tão embrionária e complicada. Uma vez que as aulas de Fitoquímica e Farmacognosia me despertaram imenso o interesse, é também graças à Professora Maria Graça Miguel que escolhi do tema desta tese.

Agradeço também à Professora Doutora Isabel Ramalhinho que sem dúvida foi uma excelente Orientadora de Estágio, que sempre me apoiou de forma total quando precisei e que sempre me deu bons conselhos. Um grande obrigado pela sua persistência, uma vez que não desistiu de mim e inclusive me estimulou a completar a tese.

A toda a minha família, e em particular à minha mãe Lídia que sempre acreditou que era capaz e nunca desistiu de mim e ao meu pai Manuel. Um obrigado pelas velinhas e pela paciência que sempre tiveram comigo. Sempre tive um apoio incondicional nos bons e maus momentos, e todos eles tornaram o meu desenvolvimento académico possível, porque sem eles, não teria alcançado nada do que tenho hoje. Um obrigado não é suficiente por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim. Os meus Avós Avelino, Maria “*in memoriam*”, Carolina e João “*in memoriam*” também merecem um enorme destaque, porque mesmo tendo uma idade mais avançada, sempre me estimularam a estudar e a procurar um futuro melhor.

Aos meus irmãos que sem dúvida, e à semelhança de em outros momentos me guiaram e me apoiaram sempre com a maior estima.

Ao meu namorado, Francisco, por me ter feito sentir capaz de superar qualquer adversidade estando sempre do meu lado e sendo o meu porto seguro e que sem dúvida me aturou.

Não posso deixar de agradecer também aos meus amigos que à semelhança de noutros momentos estiveram sempre ao meu lado.

Resumo

Bixa orellana L., conhecida também por urucum, pertence à família Bixaceae, e foi uma das primeiras plantas a serem cultivadas na floresta Amazónica, com uma longa tradição na aplicação medicinal. Quando os portugueses chegaram à nova colónia, Pedro Vaz de Caminha o escrivão da frota, deixou registadas as primeiras impressões do local e dos habitantes, referindo esta planta. Esta monografia descreve as particularidades fitoquímicas e farmacológicas desta espécie vegetal bem como do corante que dela se extrai, que possui uma coloração avermelhada devido à presença do carotenoide bixina, presente nas sementes ou no seu pericarpo. Os principais compostos ativos do urucum são a bixina que é lipossolúvel e a norbixina que é hidrossolúvel. Estas têm também aplicações comerciais e as suas diferenças estruturais resultam em particularidades a nível da polaridade, solubilidade, coloração e, por consequência, determinam aplicações tecnológicas singulares. O corante bixina tem diversas aplicações, nomeadamente nas seguintes áreas: indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e como corante. Este corante é comercialmente conhecido como E160b, sendo considerado seguro para o consumo humano. Contudo, as várias partes da planta apresentam constituintes químicos de *Bixa orellana* que apresentam várias aplicações a nível medicinal.

Palavras-chave: “Anatto”, “Fitoquímica”, “Atividade biológica”, “Corante”.

Abstract

Bixa orellana L., usually known as urucum, belongs to the Bixaceae family. It was one of the first plants cultivated in the Amazon forest, traditionally used for medicinal purposes. Upon arrival of the Portuguese fleet at the Amazon forest, one of the scribes named Pedro Vaz de Caminha wrote his first impressions of the newly-discovered place and of its inhabitants, referring to this plant. This manuscript describes the phytochemistry and pharmacological properties of the *Bixa Orellana*, as well as the dye, extracted either from the pericarp or its seeds. The dye has a reddish coloration due to the presence of carotenoid bixin. Bixin (liposoluble) and norbixin (hydrosoluble) are the main components of urucum. These two components have many commercial uses and due to its individual structural differences regarding polarity, solubility and colour, they also have certain purposes in technology.

Bixin dye has several uses in the food industry. It also finds wide use in cosmetics, pharmacy and for dyeing purposes. Commercially, it is known as E160b and is considered safe for human consumption. Aside from these uses, the many parts of the plant are comprised of other chemical compounds used in medicine. Since it is used in several biological applications, indicates its potential use as an active ingredient in pharmaceutical products.

Keywords: "Anatto", "Phytochemistry", "Biological activity", "Dye".

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo	iv
Abstract.....	v
Lista de Abreviaturas	x
1. Introdução	1
2. Metodologia	3
3. Antecedentes históricos da <i>Bixa orellana</i>	4
4. Classificação botânica.....	7
5. Descrição da planta	7
5.1. Clima.....	11
5.3. Colheita	13
5.4. Propagação.....	14
6. Variedades Principais da planta	15
7. Componentes químicos principais das partes utilizáveis de urucum	17
7.2. Bixina (C ₂₅ H ₃₀ O ₄).....	20
7.3. Norbixina (C ₂₄ H ₂₈ O ₄)	21
8. Extração dos pigmentos de <i>Bixa orellana</i>	22
8.1. <i>Bixa orellana</i> como corante	22
8.2. Uso cosmético de <i>Bixa orellana</i>	24
9. Legislação	25
10. Toxicidade.....	26
11. <i>Bixa orellana</i> como planta medicinal	27
12. Princípios terapêuticos	29
12.1. Teste de toxicidade aguda	29
12.2. Avaliação do efeito de pentobarbitona na indução do sono.....	30
12.3. Atividade neurofarmacológica.....	31

12.4. Avaliação da atividade anticonvulsiva	31
12.5. Avaliação da atividade analgésica.....	31
12.6. Avaliação da atividade antidiarreica	32
12.7. Motilidade gastrointestinal.....	32
12.8. Atividade antimicrobiana	33
12.9. Atividade anti-inflamatória	34
12.10. Anti-ulceroso	34
12.11. Cancro da próstata	37
12.12. Atividade antioxidante	37
12.13. Atividade hipoglicémico	38
12.14. Atividade diurética	38
13. Precauções/Contra-indicações/Efeitos adversos.....	39
14. Papel do farmacêutico	42
15. Conclusão	43
16. Bibliografia.....	44

Índice de figuras

Figura 1 - Arbusto da <i>Bixa orellana</i> (Mónica Orfão, 2018).....	8
Figura 2 - Flor da <i>Bixa orellana</i> (Mónica Orfão, 2018).....	8
Figura 3 - Broto jovem (A); Boto com pétalas parcialmente expostas(B); Flor (C); Desenvolvimentos de frutos com 2 dias (D) e com 7 dias (E) (20).	9
Figura 4 - Cápsulas de urucum aberta com as sementes expostas (Mónica Orfão, 2018).....	10
Figura 5 - Folha do urucum (Mónica Orfão, 2018).	11
Figura 6 - As diferentes fases de maturação das cápsulas (Mónica Orfão, 2018).....	14
Figura 7 - <i>Bixa orellana</i> planta produzindo cápsulas ovóides (A), cápsulas cónicas (B), ou cápsulas hemisféricas (C). Flor rosa em uma variedade de cápsulas ovais (D). Flor roxa em uma variedade de cápsula cónica (E). Flor branca em uma variedade de cápsulas hemisféricas (F). cápsulas ovóides (G). Cônica grupo de cápsulas (H). Grupo de cápsulas hemisféricas (I). cápsula ovada (J), cápsula cónica (K) e cápsula hemisférica (L). cápsula ovada deiscentes (M), cápsula cónica deiscentes (N) e cápsula hemisférica deiscentes (O). (26)	16
Figura 8 - Diferenças morfológicas nas folhas de variedades de <i>B. orellana</i> com formas diferentes. Folha de uma variedade de cápsulas ovais de flor rosa (A), uma folha de uma variedade de cápsulas cónicos de flor roxa (B) e uma folha de variedade de cápsula hemisféricos de flores brancas (C). Barras de escala = 6,0 cm. (33)	17
Figura 9 - Inter-relação dos pigmentos de <i>Bixa orellana</i> L.	21

Índice de tabelas

Tabela 1 – Classificação de <i>Bixa orellana</i> . (21)	7
Tabela 2 - Classificação das sementes da <i>Bixa orellana</i> L., segundo as suas características físico-químicas. (38).....	18
Tabela 3 - Informação Nutricional dos compostos da <i>Bixa orellana</i> L. (41)	20
Tabela 4 - Contra-indicações/ Efeitos adversos.....	39

Lista de Abreviaturas

%	Percentagem
µL	micrólitro
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CE	Comunidade Europeia
CEE	Comunidade Económica Europeia
CI	Colour Index
CYP 450	Citocromo P450
DMSO	Dimetilsulfóxido
E160b	Food manufacture used as urucum dye
EU	European Union
FAO	Food Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
g	grama
GRAS	Generally Recommended As Safe
HBP	Benign Prostatic Hyperplasia
HDL	Colesterol de alta densidade
I.P	Via Intraperitoneal
IgE	Imunoglobulina E
JECFA	Joint Expert on Food Additives
KOH	Hidróxido de potássio

LD₅₀	Lethal Dose, 50%
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
mg	miligrama
mg/kg	miligrama por kilograma
mg/mL	miligrama por mililitro
ml	mililitro
ml/kg	mililitro por kilograma
mm	milímetro
NaOH	Hidróxido de sódio
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
° c	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
SNC	Sistema Nervoso Central
USA	United States of America
UVB	Ultra Violet type B
V.O	Via Oral
v/v	volume/volume

1. Introdução

Desde há muito tempo que a humanidade utiliza, de forma regular e muito ativa, os medicamentos à base de plantas. (1)

Bixa orellana L. (achiote, anatto, urucum, urucu, urucueiro) é uma árvore proveniente da região amazónica conhecida popularmente por “urucum”, palavra que deriva do “Guaraní (ru-ku)” o “urucum” que significa vermelho e tem origem da América Latina. O primeiro corante vegetal a ser comercializado em grande quantidade para a Europa foi o urucum, mas na América Latina já há vários séculos que era um produto muito utilizado nos seus alimentos e tradições. (2–4)

A sua cápsula possui características muito específicas que tem permitido a obtenção de extratos lipossolúveis ou hidrossolúveis a partir das suas sementes. O corante extraído destas sementes é estável e liga-se às proteínas, o que tem permitido a sua utilização como corante alimentar. (5,6)

Foi detetado nos anos 70 que muitos dos corantes sintéticos utilizados na indústria eram cancerígenos. Foram detetados não só na Europa, mas também em vários países uma série de problemas em relação a estes compostos, levando à sua proibição para o consumo humano. Em 1990 a FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos proibiu a utilização de alguns destes corantes sintéticos de forma definitiva. Perante esta situação, é dada uma maior importância aos corantes naturais, uma vez que as restrições à sua utilização têm sido menores do que aquelas que afetam as cores artificiais. O corante extraído de *B. orellana* é considerado inofensivo e a sua toxicidade é praticamente nula, não só após a ingestão como após contacto com a pele. Esta é uma substância com alta resistência a componentes químicos, sendo muito adequada para a utilização em todo o tipo de bebidas e alimentos e até mesmo em cosmética. (7)

O urucueiro é muito utilizado na medicina tradicional, particularmente como anti-diabético e antibacteriano, embora existam outros tipos de aplicações, que serão abordados posteriormente. A bixina que é extraída de *B. orellana* representa cerca de 80% de todos os carotenoides existentes, apresentando uma coloração vermelho-amarelada. A partir da bixina é possível obter a norbixina (lipossolúvel). (5,6,8,9)

Na indústria farmacêutica existe uma procura de alternativas de pigmentos de origem natural, a fim de serem utilizadas como excipientes em diferentes formas farmacêuticas (pomadas, emplastos, coloração histológica, etc.). Os corantes provenientes do urucueiro podem ser também usados em repelentes de insetos e protetores solares, como também em alimentos. (10-12)

Esta monografia tem como objetivo principal aprofundar o conhecimento sobre *B. orellana*, no que diz respeito às suas características botânicas, ao seu uso convencional e aos seus atributos terapêuticos, assim como dar a conhecer as suas contra-indicações e transmitir algumas advertências e precauções a tomar. Ao longo deste trabalho são apresentados alguns trabalhos de investigação, considerados relevantes para o possível desenvolvimento, a longo prazo, de uma terapêutica onde o urucum faça parte.

2. Metodologia

A presente dissertação de mestrado contempla uma revisão bibliográfica sobre *Bixa orellana* L. para que se disponha de informação fundamentada acerca da utilização da planta atualmente.

Para o desenvolvimento do presente trabalho fez-se uma pesquisa da literatura existente recorrendo a revistas científicas, livros e relatórios. Algumas das bases de dados utilizadas como apoio foram: Scielo, ScienceDirect, SciFinder, Medline, PubMed, B-on e Google Scholar. Durante este processo de pesquisa foram usadas diferentes palavras-chave, tais como: “*Anatto*”, “*Bixa orellana*”, “Fitoquímica”, “Classificação botânica”, “Farmacologia”, “Interações medicamentosas”, e “Corante”.

Durante todo o processo de pesquisa e no desenvolvimento desta monografia foi recolhida toda a informação considerada mais importante e ao mesmo tempo atualizada acerca deste tema, incluindo o ano 2018. Parte da informação tratada abrangeu 3 idiomas: Português, Espanhol e Inglês. No entanto, foi totalmente adaptada ao idioma pretendido nesta monografia.

3. Antecedentes históricos da *Bixa orellana*

Até à viagem de Colombo, *Bixa orellana* L. (achiote, anatto, urucum, urucu, urucueiro) era uma planta desconhecida para os Europeus. Depois de encontrar a Ilha San Salvador (ilha Watling até 1925), que pertence às Bahamas, Cristóvão Colombo fez a primeira referência histórica ao urucum e à semente usada como corante, descrevendo as pessoas nativas que vieram ao seu encontro, da seguinte forma: “eles pintam as caras, os seus corpos, olhos e nariz em preto, branco e vermelho”. (2,13)

Após ter visitado uma outra ilha nas proximidades, apelidada Fernandina, Colombo descreveu: “encontrei um homem sozinho na sua canoa indo da ilha de Santa Maria para Fernandina, o homem segurava um pedaço de pão na sua primeira vez, carregando água na sua cabeça cabaças de água e um pouco de terra vermelha amassada, e com algumas folhas secas (tabaco) em que são muito apreciadas por este tipo de população”. As descrições anteriormente feitas enaltecem a ideia de importância que as culturas pré-colombianas depositavam no urucum. No dia 1 de maio de 1500, conforme Mendes-Ferrão (1993), Pedro Vaz de Caminha dirigiu uma carta, na costa onde hoje é o Brasil, ao Rei D. Manuel de Portugal, de Porto Seguro de Vera Cruz, onde descreveu o que alguns nativos traziam: "Traziam alguns deles uns ouriços verdes, de árvores, que, na cor, queriam parecer de castanheiros, embora mais e mais pequenos. E eram aqueles cheios duns grãos vermelhos pequenos, que, esmagados entre os dedos, faziam tintura vermelha, de que eles andavam tintos. E quanto mais se molhavam, tanto mais vermelhos ficavam". (2)

Num dia, em Honduras (1502), no norte da costa, Cristóvão Colombo avistou centenas de nativos e descreveu o seguinte: “a cara pintada com vermelho e preto, tentando ficar mais bonitos, porém invés de ficarem mais bonitos pareciam eram demónios”. (2)

Gonzalo Fernandez de Oviedo (1535) mencionou igualmente que o urucum era muito abundante no Caribe e no continente sul-americano, tendo feito uma ótima descrição da planta, dos frutos, e do modo como os nativos preparavam e usavam o corante urucum. (2)

Posteriormente, em 1552, Lopez de Gomara, enquanto descrevia os Hispaniola habitantes, citou que as suas armas eram constituídas por pedras chamadas “macanas”, que eram usadas como espada e lança. (2)

Quando havia lutas, os indígenas penduravam pequenos ídolos na testa e manchavam os seus corpos com “jagua” (*Genipa americana* L.) e com “bija” (urucum). Os seus grãos são viscosos como cera de abelha e têm um corante encarnado. Com este corante, as mulheres pintavam-se, ficando com a pele em tom avermelhado, com o intuito de dançar as danças típicas e rituais do povo. Os Nativos da América do Sul utilizavam ceras e gorduras extraídas de animais ou plantas e resinas. Quando usavam este tipo de produtos reforçavam a ação protetora do urucum contra os insetos. (9,14,15)

Desde 1560, que os barcos carregavam como mercadoria principal pérolas, cacau, baunilha e urucum em direção aos portos de Espanha. (2) O urucum era tido em alta consideração pelos europeus. Mais tarde, em 1596, Raleigh descreveu os tesouros encontrados no sul do rio Orinoco. O mesmo expôs:” há grandes quantidades de comida brasileira e muitas bagas que produzem cor vermelha e rosa, corantes perfeitos para fazer pinturas”, o mesmo que a França, a Itália ou a Índia oriental já faziam. (2)

Quanto mais a carne era lavada com o corante urucum, mais vistosa e bonita ficava tendo em conta a cor avermelhada do corante. (16) Na cultura dos indígenas fazia-se também uma bebida típica com esta planta, usada em rituais para parecer sangue e ainda faziam uma mistura de urucum com cacau para melhorar a sua cor e ao mesmo tempo o seu sabor. (13)

Hernandez, na história natural da Nueva España (1605), relatou que o urucum era conhecido pelo nome de “chacangariqua” e “pamacua”. (2)

Gage, em 1648, durante as suas viagens à Nueva España, descreve que na região Zocos, que atualmente se chama Guatemala, refere: “é uma rica Região devido à produção de cacau e de outra droga chamada “achiote” (urucum), as suas sementes são usadas para corar o chocolate e fazer a pasta com o nome de terra de orellana.”

Ainda segundo Gage, a árvore podia ser encontrada em todas as ilhas tropicais”. Gage confirmou também que se pode usar no tratamento de muitas doenças e escreveu como a *B. orellana* é preparada através das suas sementes. (2)

Este historial evidencia e indica que existe um cultivo de urucum e até mesmo uma ampla distribuição ao longo dos países tropicais americanos, com temperaturas quentes e húmidas antes da chegada do Colombo. Posteriormente, o urucum foi distribuído um pouco por todo o mundo, pelos países com humidade tropical e subtropical, graças aos espanhóis e aos portugueses conquistadores e exploradores dos séculos XV e XVI. (2,13,14)

B. orellana foi usada para pinturas, tatuagens, simbolicamente como agradecimento aos deuses pelas colheitas, pescas e a saúde, e também como repelente de insetos, por algumas tribos nativas da América do Sul. (2,4,14)

Os argumentos usados por Alejandro Humboldt, relativamente às tribos indígenas que habitavam em terras perto do Rio Orinoco revelam que estas tribos não usavam roupas, apenas usavam pinturas, as quais eram extraídas da *B. orellana*. (3,13)

A planta nativa da América, que foi levada para a Europa desde o século XVII, fez com que os ingleses tivessem conhecimento do corante do urucum e que começassem a usá-lo na fabricação de queijos, por exemplo, pois este corante não perde a coloração durante a cura, e ainda se consegue ligar à proteína do leite, mantendo assim a coloração apresentando desta forma uma coloração mais vistosa e não a cor branca. (17)

Em 1983, a produção a nível mundial do urucum foi de 3.000 toneladas de sementes, no entanto, com o passar dos anos tem sido um produto cada vez mais utilizado não só na América Latina como também na União Europeia, tendo aumentado para 10.000 toneladas por ser um corante natural. Um dos principais países na produção de urucum é o Brasil, onde se produz mais de metade de urucum. (9,13)

4. Classificação botânica

Bixa orellana pertence à família Bixaceae. *Bixa* provem da forma latinizada da palavra índia *Bija* e o nome *orellana* foi dado em homenagem ao descobridor Espanhol Francisco Orellana, que descobriu o rio Amazonas (1490-1546) do século XVI. (18–20)

O Sistema de Engler classifica *B. orellana* de acordo com o que está descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação de *Bixa orellana*. (21)

XVIII Divisão:	Angiospermae
Subdivisão:	Angiosperma
Classe:	Dicotiledoneae
Ordem:	Parietales
Subordem:	Cistianeae
Família:	Bixaceae
Género:	<i>Bixa</i>
Espécie:	<i>Bixa orellana</i> L., Sinónimos: <i>Bixa americana</i> Poir., <i>Bixa purpurea</i> Sweet, <i>Bixa upatensis</i> Ram. Goyena, <i>Bixa tinctoria</i> Salisb.

5. Descrição da planta

B. orellana L. é uma espécie de regiões tropicais da América, que é conhecida pelos seguintes nomes comuns: achiote, urucum, urucu, anatto, orellana, changerica, entre outros, conforme as zonas do globo. (21)

É um arbusto com altura entre os 3 e os 5 metros (Figura 1), cujas folhas são simples e grandes. As flores estão dispostas em grupos e as suas cores variam de esbranquiçada a rosa, dependendo da variedade. As pétalas são dialipétalas e espaçadas entre si, com cinco sépalas (Figura 2), surgindo nas extremidades dos ramos. (14)



Figura 1 - Arbusto da *Bixa orellana* (Mónica Orfão, 2018)



Figura 2 - Flor da *Bixa orellana* (Mónica Orfão, 2018).

A flor do urucum é hermafrodita, contudo a flor não pode autofecundar-se devido à protandria que faz com que os grãos de pólen estejam viáveis ou maduros anteriormente às

anteras se apresentarem recetivas. O grão do pólen fica maduro na véspera da abertura da flor e os estames duram apenas um dia, obstruindo deste modo a autopolinização. Devido a esta situação a fecundação acontece apenas devido à polinização cruzada, que normalmente é realizada por ventos ou por insetos (entomófila). Esta polinização favorece a ocorrência de uma maior diversidade de atributos do fenótipo, características estas que irão influenciar no teor de bixina nos grãos e nos frutos. (22)

Há flores na planta de urucum praticamente durante todo o ano, contudo, há uma maior intensidade em duas estações em circunstâncias de clima consideradas normais, a primeira floração é mais intensa entre os meses de fevereiro e março, uma vez que a colheita principal ocorre de junho a julho. A segunda floração ocorre nos meses de julho e agosto, sendo que a colheita acontece em novembro e dezembro. Ambas as colheitas são geralmente feitas de forma manual, uma vez que a maior parte da produção do urucum provém da agricultura familiar. Relativamente à duração que há entre abertura das flores e o seu amadurecimento (Figura 3), poderá variar de sítio para sítio, mas pode variar entre 100 e 140 dias. (20,22)



Figura 3 - Broto jovem (A); Boto com pétalas parcialmente expostas(B); Flor (C); Desenvolvimentos de frutos com 2 dias (D) e com 7 dias (E) (20).

O fruto é uma cápsula vermelha de 2 a 6 centímetros de comprimento, com “cabelos” espinhosos maleáveis, que evolui da tonalidade verde-escuro e quando atinge a maturação sofre uma transição apresentando uma cor avermelhado escuro. As sementes apresentam 5 milímetros de comprimento e com um diâmetro até 3 milímetros, revestidas com uma substância viscosa avermelhada (Figura 4). Estas sementes apresentam uma forma que varia entre piramidal a quase cônica. É nesta camada que se encontram os pigmentos,

tendo uma importante aplicação industrial. No pericarpo, 80% dos pigmentos existentes é constituído por um carotenoide com o nome de bixina, corante que pode ser obtido usando óleos vegetais como solvente de extração. No entanto, é constituído por mais compostos, ainda que sejam substâncias inertes de menos relevância. A cápsula contém entre 30 a 40 sementes (Figura 4) em média, excepcionalmente poderá existir cápsulas com 70 sementes. A coloração da semente pode variar desde o vermelho escuro, o que significa que tem maior concentração de corante, até uma cor rosada claro que apresenta menor concentração de corante. (21,23)

Esta semente tem grande importância, pois é rica em pigmentos que podem ser aplicados em várias indústrias. Os corantes do urucum poderão ser extraídos através de uma solução alcalina aquosa, ou através de óleo vegetal, originando desta forma sais de norbixina na forma hidrossolúvel e a bixina que apresenta na forma lipossolúvel. (23)



Figura 4 - Cápsula de urucum aberta com as sementes expostas (Mónica Orfão, 2018).

As folhas apresentam-se em forma de coração, dispostas em forma de espiral e podem medir de 8 a 20 cm de comprimentos e 4 a 15 cm de largura, tendo uma estrutura peciolada, isto quer dizer que tem uma nervação da folha peninérvea com nervuras

secundárias e terciárias ao longo da folha, tendo uma borda com o limbo ondulada e pequenas ondulações ao longo da folha (Figura 5). (14)



Figura 5 - Folha do urucum (Mónica Orfão, 2018).

O tronco apresenta uma cor castanho café, podendo atingir até 5 metros de altura, com uma forma cilíndrica, tendo um diâmetro de base ente 10 a 15 cm, podendo existir algumas delas com um diâmetro superior a 30 cm, assim como as suas raízes ramificadas, onde da raiz principal grossa crescem mais raízes secundárias e terciárias que se encontram distribuídas no solo, mais finas e apresentando cor café escuro. Estas raízes podem atingir aproximadamente 30 cm de profundidade, podendo a raiz principal atingir até 1 m de profundidade. (21,23)

5.1. Clima

B. orellana é heliófila, isto é, necessita de luz solar para se desenvolver. Para esta planta ter um cultivo favorável para o seu desenvolvimento, a temperatura do meio

ambiente deverá variar entre 20 °C e 27 °C, considerando-se que 25 °C é a temperatura ideal. Ainda que as temperaturas máximas sejam de 36 °C a 38 °C e como temperatura mínima de 15 °C, desenvolvendo-se melhor em áreas, em que a pluviosidade esteja entre um mínimo de 1200 mm e um máximo de 3000 mm, sendo necessário também um período de precipitação entre 3 a 4 meses, essencial para que ocorra a maturação e desenvolvimento favorável dos frutos. Se houver ausência de chuvas superior a 3 meses, isto será prejudicial para a sua produtividade. A humidade relativa ideal está por volta dos 80%, se ultrapassar esta percentagem pode haver o desenvolvimento de fungos. (22)

Ao ocorrer variações de temperaturas acentuadas do período diurno para o período noturno, assim como ventos frios e fortes à noite, estes são fatores que criam um ambiente desfavorável para o desenvolvimento da planta, fazendo lesões, nomeadamente nas folhas, que, por sua vez irá diminuir a eficácia fotossintética, conseqüentemente retarda o seu desenvolvimento e a produção da planta. (24)

5.2. Solo

Urucum é uma planta tropical que se adapta a diferentes tipos de solos, desenvolvendo-se melhor em solos mais húmidos, profundos, drenados e com uma composição um pouco argilosa, não sendo favoráveis para o desenvolvimento desta planta solos compactados e com um clima ameno. Tendo em conta que é uma planta rústica e tolerante, o urucum tem a capacidade de se adaptar a diferentes tipos de condições, existindo a possibilidade de ser cultivado em solos pobres em termos nutricionais. Conseqüentemente, esta produtividade será inferior, quando comparada a um cultivo de um solo de alta fertilidade. (22)

Todavia, apesar de ter uma baixa exigência nutricional este deverá desenvolver-se em solos com macronutrientes e micronutrientes que se encontrem equilibrados, tendo uma variação média alta com um pH entre 5 a 7, sendo preciso bons níveis de cálcio e magnésio e ausência de alumínio tóxico. (22)

Para plantar urucum é necessário proceder previamente a uma análise do solo onde se vai fazer a plantação da planta. Para isso, devem retirar-se várias quantidades de solo de

várias partes da área onde será realizada a plantação, a fim de determinar o pH do solo, para analisar eventuais deficiências nutricionais dessa área, sendo muito importante esta análise, pois através dela é possível saber que tipos de nutrientes se encontram em baixa concentração para proceder à sua correção. (26-28)

5.3. Colheita

A maturação das cápsulas de urucum tem uma duração de 3 a 4 meses e a colheita das mesmas é realizada de forma manual. A cor das cápsulas varia durante o período de maturação que vai desde o verde, cor imatura, a amarelo, e quando apresenta uma cor castanha avermelhada significa que se encontra no seu estado de maturação ideal para que se proceda à sua colheita (Figura 6). Normalmente a primeira colheita ocorre nos meses de junho e julho e a segunda colheita é feita entre o período de novembro e dezembro. (22)

A identificação da maturação da cápsula é essencial, visto que influencia a qualidade final do produto. Esta conjuntura é verificada aproximadamente 140 dias após a abertura das flores, apenas quando estas ficarem secas e apresentarem uma coloração castanha (Figura 6). É essencial que ao colher as cápsulas estas estejam mesmo maduras e secas, pois a apresentação de uma elevada humidade nas sementes fará com que perca a qualidade e também o desenvolvimento de bolores. Quando se realiza a colheita, pode-se utilizar uma tesoura de poda ou uma faca, para cortar os pedúnculos o mais adjacente possível das cápsulas. (22,24)

É necessário ter muito cuidado na pós-colheita das sementes. Este procedimento terá que ser bem realizado, visto que influencia a qualidade do produto final. O processo de pós-colheita inclui: pré-secagem dos frutos para garantir que estão secos e não têm humidade; descapsulamento, no qual se faz a abertura da cápsula e a análise das sementes; secagem das sementes; peneiramento; armazenamento; classificação e, por fim, a comercialização. (24)



Figura 6 - As diferentes fases de maturação das cápsulas (Mónica Orfão, 2018).

5.4. Propagação

A propagação do urucum tem sido maioritariamente por sementes. Devem ser colhidas as cápsulas diretamente da planta, quando a mesma está a iniciar a abertura espontânea (deiscentes), para que seja feita a propagação através das sementes (sexuada). Posteriormente, as sementes são deixadas ao sol para completar a abertura e a libertação, visto que as mesmas não se soltam com facilidade. Deverão ser removidos manualmente batendo nas cápsulas com uma vara para dentro dos sacos. As sementes são viáveis por mais de 6 meses após o seu armazenamento. (27)

Para a realização das mudas, as sementes são colocadas para germinação, após serem colhidas e sem qualquer tipo de tratamento em canteiros semi-sombreados, contendo substrato formado por terra vegetal, argila e adubo. Estes canteiros são cobertos com um substrato previamente tamisado e regados diariamente. (27)

Quando as plântulas atingem entre 5 a 8 centímetros deverão ser transplantadas para sacos de polipropileno. Por norma, o desenvolvimento das plântulas é um processo bastante rápido, no entanto, a sua transferência para o local final poderá ocorrer em menos de 3 meses. (27)

A propagação do urucum pode ser também por enxertia, havendo vários modos de a fazer: vários tipos de garfagem e borbulhia. (8,24)

Visto o urucum ser uma espécie de polinização cruzada, resulta num processo de alto grau de variabilidade genética, originando uma grande heterogeneidade nos plantios,

como é o caso da tolerância às pragas e doenças. Na produtividade reflete-se em variações no teor de bixina, no período de floração promove falta de sincronismo na coloração das flores e cápsulas, e na forma e quantidade de pêlos nas cápsulas. (28,29)

As diferentes técnicas de cultivo em *in vitro* de órgãos ou de tecidos vegetais têm importância na propagação vegetativa ou na regeneração de espécies, e nos cultivares de interesse hortícola. O uso de uma técnica concreta varia de acordo com o objetivo que se pretende e a sua capacidade de reconstituir plantas está demarcada pelo genótipo, condições de cultura (nutrientes, reguladores de crescimento e condições físicas) e pelo estado de desenvolvimento da planta-mãe. Hoje em dia, dispõem-se de informações relevantes relativamente às necessidades para a propagação vegetativa em *in vitro* de numerosas espécies vegetais, sendo uma delas o urucum. (33-35)

6. Variedades Principais da planta

As três variedades da *B. orellana* são diferenciadas pelas cores das suas flores e sementes. Uma das variedades de *B. orellana* tem flores brancas e cápsulas verdes, outra variedade é constituída por flores de cor roxa e as suas cápsulas são de cor castanhas-avermelhadas e, por fim, a terceira apresenta flores cor-de-rosa e cápsulas vermelhas (Figura 7). Estas diferenças de cor não têm influência relativamente ao efeito terapêutico nem à alteração a nível do sabor. (33) Porém, ainda têm sido observadas algumas pequenas variações ao nível da cor ou na forma da cápsula, ainda que não existam informações disponíveis relativamente a este tipo de variações. Logo, estes tipos de *B. orellana* não apresentam nomes específicos e não têm subespécies verdadeiras, visto que a alteração da composição genética é tão insignificante. Contudo, há estudos que indicam que o teor dos pigmentos das sementes pode variar entre os 5 % em cápsulas hemisféricas e 3-3,5 % em variedade cónica e 1,5-2% em variedade ovada (Figura 7). (33)

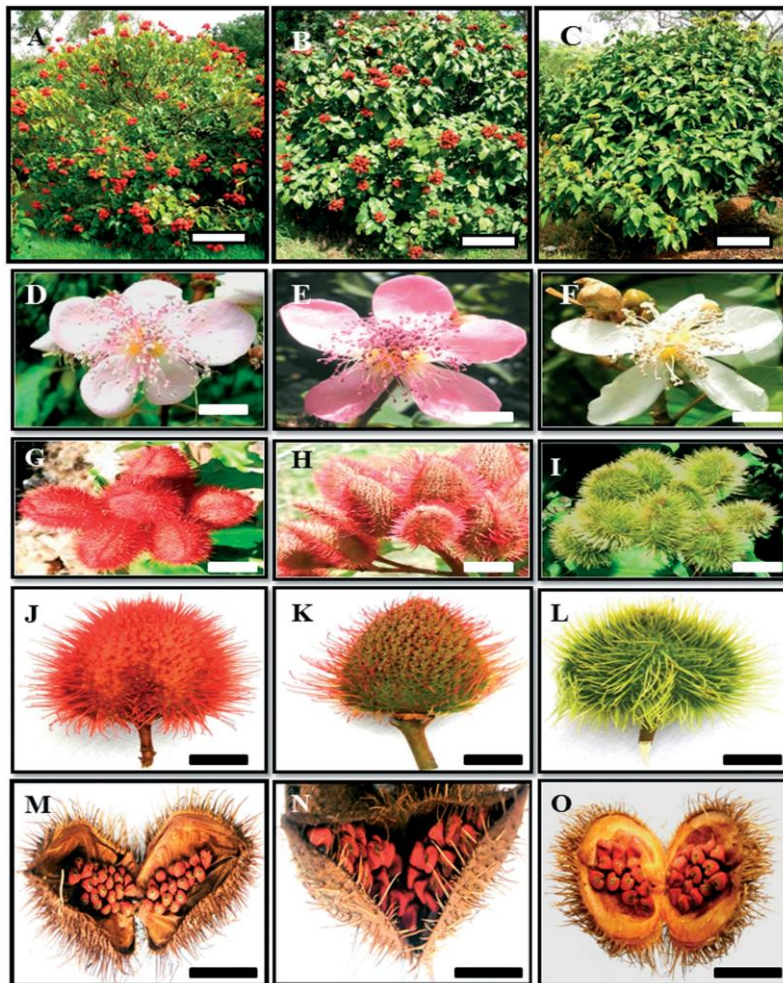


Figura 7 - *Bixa orellana* planta produzindo cápsulas ovóides (A), cápsulas cónicas (B), ou cápsulas hemisféricas (C). Flor rosa em uma variedade de cápsulas ovais (D). Flor roxa em uma variedade de cápsula cônica (E). Flor branca em uma variedade de cápsulas hemisféricas (F). cápsulas ovóides (G). Cônica grupo de cápsulas (H). Grupo de cápsulas hemisféricas (I). cápsula ovada (J), cápsula cônica (K) e cápsula hemisférica (L). cápsula ovada deiscentes (M), cápsula cônica deiscentes (N) e cápsula hemisférica deiscentes (O). (26)

Relativamente às cores das folhas das diversas variedades, nas árvores que têm flor branca, as folhas apresentam uma cor verde-escuro, enquanto nas plantas que apresentam flores cor-de-rosa ou roxas as folhas apresentam uma cor verde clara (Figura 8). (26,34,35)

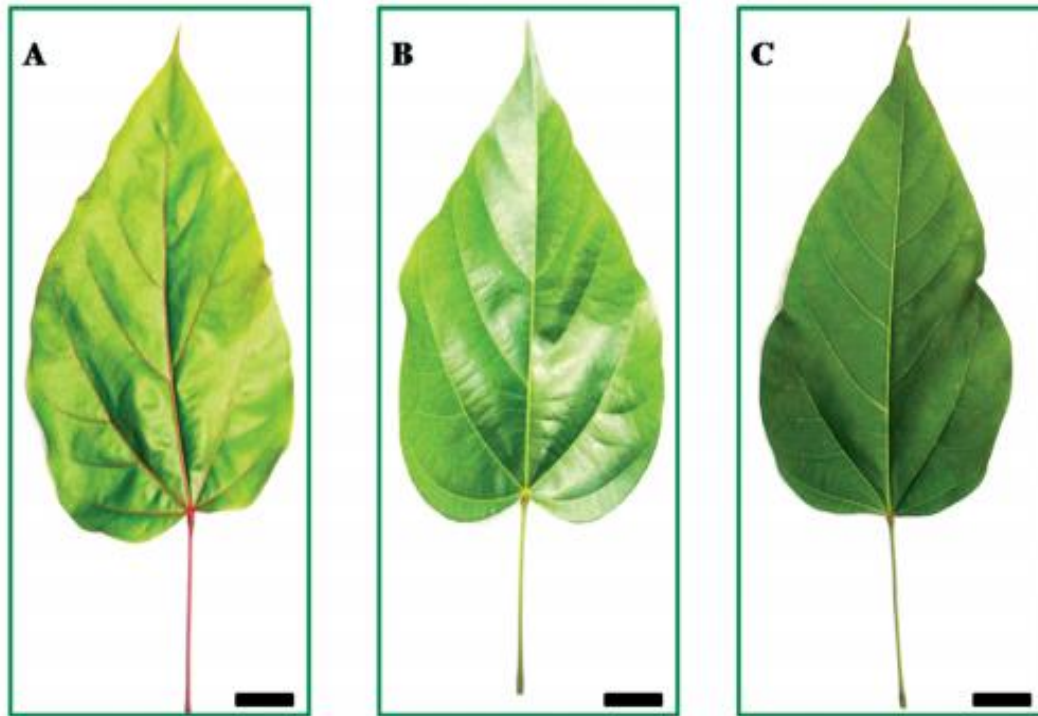


Figura 8 - Diferenças morfológicas nas folhas de variedades de *B. orellana* com formas diferentes. Folha de uma variedade de cápsulas ovais de flor rosa (A), uma folha de uma variedade de cápsulas cónicas de flor roxa (B) e uma folha de variedade de cápsula hemisféricos de flores brancas (C). Barras de escala = 6,0 cm. (33)

7. Componentes químicos principais das partes utilizáveis de urucum

As partes utilizadas incluem as flores, sementes, folhas e raízes. Para além do pigmento das sementes, a planta de urucum também é uma fonte de vitaminas do complexo B e vitamina C. (36,37)

Planta: riboflavina, cianidina, niacina, ácido salicílico, ácido tomentósico e ácido elágico. As folhas também apresentam uma fração volátil onde é possível encontrar os sesquiterpenos ishwarano e bixaganeno. (38–40)

Sementes: lípidos, minerais (cálcio, ferro, fósforo), proteína, aminoácidos (arginina, leucina, lisina, isoleucina, fenilalanina, histidina, treonina, metionina, triptofano, valina), terpenoides (bixina, norbixina, isobixina).

Cápsula: lípidos, ferro, fósforo, ácido ascórbico, terpenoides (β -carotenoides, bixol), hidratos de carbono e fibra.

Para a classificação das sementes do urucum é essencial que estas estejam dentro dos parâmetros referidos na Tabela 2. (34)

Tabela 2 - Classificação das sementes da *Bixa orellana* L., segundo as suas características físico-químicas. (38)

Especificação	Classe		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Humidade	≤ 10%	>10% ≤ a 14%	>14%
Bixina	> 2,5%	2,0 a 2,5%	<1,8%
Impurezas	< 5%	<5%	> 5%
Material Estranho	Ausente	Ausente	Ausente

Para efeito de padronização das sementes são considerados os seguintes fatores: (38)

- 1) Humidade: percentagem de água contida na amostra;
- 2) Conteúdo de bixina: percentagem de pigmento contido no pericarpo da semente (matéria prima na indústria de corantes);
- 3) Aroma: cheiro típico desejado, aromático, penetrante;
- 4) Impurezas: detritos do próprio produto, como pedúnculos e folhas;
- 5) Material estranho: grãos ou sementes de outros vegetais, além de corpos estranhos de qualquer natureza não oriundos dos produtos e que não sejam nocivos à saúde humana;
- 6) Bolor: bolor proveniente de fermentação do produto provocado por fungos e/ou bactérias.

As sementes de *B. orellana* são constituídas, na sua maioria, por carotenoides, como por exemplo a bixina e norbixina, encontrando-se em maior percentagem a bixina. (10)

Citada pela primeira vez em 1825, por Boussingault, a cristalização da bixina foi conseguida com êxito em 1878 por Etti. A análise elementar e a deliberação exata da sua fórmula aconteceram, em 1917 por Panzer e por Heiduschka. Em 1928-1933, Kuhn e os

colaboradores sugeriram a fórmula estrutural, fórmula esta que foi confirmada posteriormente por Kerrer. (39)

As estruturas químicas da bixina e da norbixina estão representadas na Figura 8. Outros constituintes podem ser encontrados no urucum, como sejam aminoácidos (lisina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina); (23) lípidos, incluindo os ácidos gordos ácido linoleico, oleico e α -linolénico, assim como minerais (Ferro, Zinco, Fósforo e Cálcio). (23,40)

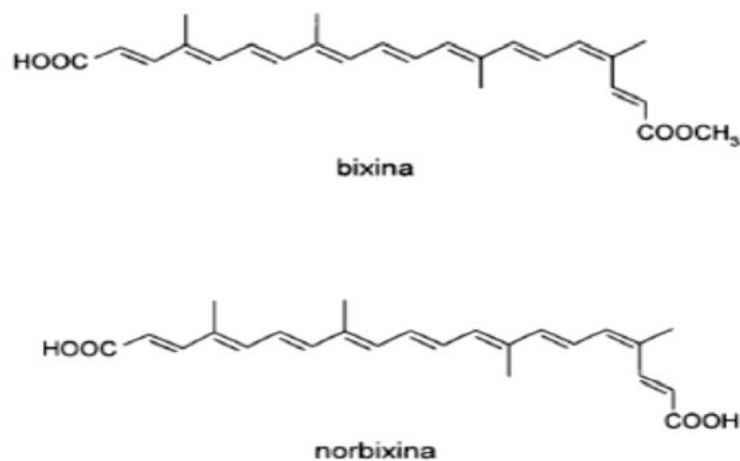


Figura 8 - Estrutura química dos principais pigmentos de *B. orellana* L.

7.1. Informação nutricional de *Bixa orellana* L.

De modo geral, a composição nutricional das sementes de urucum apresentam a seguinte distribuição: 40 a 45 % de celulose; 3,5 a 5,5 % de açúcares; 0,3 % a 0,9 % de óleo essencial; 3 % de óleo fixo; 1,0 % a 4,5 % de pigmento; 13 % a 16 % de proteína (Tabela 3), como também α - e β -caroteno, além de taninos e saponinas. Apresenta ainda 17,5 % de lípidos na forma de ácido linoleico, α -linolénico e oleico, 10,6 % de aminoácidos. As cinzas (5,4 %) apresentaram alto conteúdo de Fósforo, Ferro e Zinco, com reduzido teor de cálcio. Além da bixina e norbixina, outros carotenos são encontrados em menores quantidades no arilo da semente do urucum, entre eles isobixina, β -caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina e a orellina. (23,41)

Tabela 3 - Informação Nutricional dos compostos da *Bixa orellana L.* (41)

Compostos	% Nutricional
Celulose	40%-45%
Sacarose	3,5%-5,5%
Óleo essencial	0,3%-0,9%
Óleo fixo	3%
Pigmentos(70-80% Bixina)	4,5%-5,5%
Proteínas	13%-16%

7.2. Bixina (C₂₅H₃₀O₄)

A estrutura química da Bixina consiste numa cadeia isoprénica de 24 carbonos, tendo na sua constituição um grupo carboxílico e um éster metílico nas extremidades. O que torna este corante num dos mais utilizados é a possibilidade de, através da extração dos pigmentos das sementes, obter uma variedade de cores desde o amarelo (norbixina) até ao vermelho (bixina). Dependendo do solvente que for utilizado para realizar a extração, é possível obter um corante hidrossolúvel ou um corante lipossolúvel. (3,36,42)

A bixina tem como singularidade o facto de, entre os carotenoides, se apresentar na configuração *cis* de forma natural. Foi o primeiro *cis*-carotenóide a ser isolado de fontes naturais, a sua molécula contém um grupo carboxílico e um éster metílico que concede lipossolubilidade à molécula. Na configuração *cis*, os dois grupos estão situados no mesmo lado da molécula, o que não acontece na forma *trans*-bixina, que é mais solúvel em óleos conferindo uma coloração avermelhada, ao contrário do isómero *cis*-bixina que apresenta uma coloração alaranjada. É importante ressaltar que este tipo de composto do urucum poderá sofrer algumas alterações, sendo suscetível a mudanças na estrutura devido ao calor, à luz e à oxidação. Também pode sofrer alterações na presença de alguns solventes. Logo que a semente do urucum fica isolada, a bixina permanece mais exposta, daí é provável que ocorra a sua deterioração mais facilmente. (43,44)

Quando há a intervenção das enzimas, este facto irá originar dois novos carotenoides. Quando ocorre a perda do grupo éster metílico da bixina obtém-se a norbixina. (3)

7.3. Norbixina (C₂₄H₂₈O₄)

Com a presença do segundo grupo carboxilo na molécula, este irá aumentar a hidrossolubilidade. (45) As ligações duplas conjugadas quer na norbixina quer na bixina podem sofrer isomerização. As configurações *cis* como da bixina e da norbixina, que se encontram presentes no urucum, podem transformar-se na configuração *trans*, que é uma configuração mais estável, sempre que a molécula for sujeita a temperaturas mais elevadas (Figura 9). (43)

Apenas o pigmento natural norbixina reage com a caseína, característica esta que torna este corante único no segmento de queijo e outros produtos lácteos. (41)

A hidrossolubilidade da bixina e da norbixina pode ser aumentada com a adição de polissorbatos ou propilenoglicol, no entanto, o urucum encontra-se em várias configurações solúveis em água e em solventes orgânicos, dependendo do meio de extração e do tipo de misturas, emulsões, diluições e suspensões que se utilizam para a extração ou para a obtenção do produto final. (3,34,39)

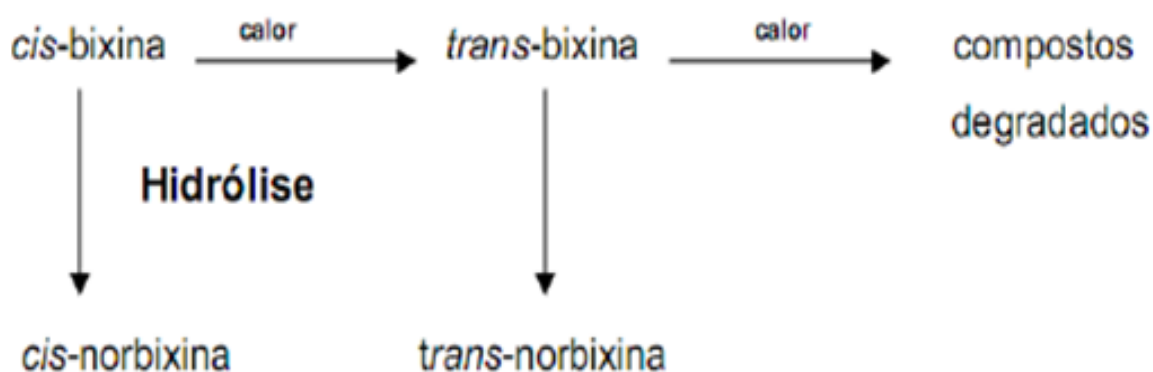


Figura 9 - Inter-relação dos pigmentos de *Bixa orellana L.*

Em suma, a bixina pode ocorrer nas configurações estereoquímicas *cis* e *trans*. Em condições normais, a que mais prevalece é a *cis*-bixina, ou *cis*-norbixina, sendo esta uma configuração mais instável do que a *trans*-bixina. (3,8,43)

As diferenças estruturais entre a bixina e norbixina, fazem com que estes isómeros tenham solubilidade, polaridade, e tonalidade distintas, como resultado, cada uma poderá ter uma aplicação distinta. Se estes corantes forem utilizados segundo os parâmetros Food Chemical Codex dos USA, é um corante seguro e sem sabor. (39)

8. Extração dos pigmentos de *Bixa orellana*

Os processos de extração dos pigmentos das sementes do urucum podem ser físico-químicos, através de solventes e enzimas, e processo mecânico, através de atrito e raspagem. (46) Já relativamente à extração por solvente através de técnicas convencionais por imersão de sementes em soluções, esta poderá ser realizada através de três processos, antes dos quais é realizada a pesagem dos grãos de urucum, colocados num recipiente com um agitador (permanecendo por um determinado período de tempo) juntamente com o solvente pretendido, onde é feita a extração com óleo de soja ou milho. A extração pode também ser feita recorrendo a solventes orgânicos, como por exemplo, etanol, acetona, clorofórmio e propilenoglicol, sendo este um dos processos que resulta na forma mais pura dos pigmentos, e, por fim, a extração alcalina, que resulta da utilização de soluções de KOH e NaOH. (8,41)

A extração com óleo produz um corante que é maioritariamente na forma de bixina. A extração aquosa alcalina saponifica o grupo metilo da bixina, produzindo assim a norbixina como principal corante natural. (47–51)

8.1. *Bixa orellana* como corante

De origens distintas, os corantes são substâncias que alteram ou fortalecem a cor, não só de alimentos como também de outros produtos (produtos de cosmética e

medicamentos). Quanto à utilização de corantes alimentares, a humanidade já o faz desde a antiguidade, extraíndo-os não só de plantas, mas também de minério. (52,53)

A observação e perceção da cor não é simplesmente uma capacidade que o ser humano tem de distinguir a luz nos diferentes tipos de onda. A cor é um estímulo originado pelo cérebro, estímulo esse que, quando é luminoso, capta mais a atenção, tornando possível distinguir as diferentes cores. Todo este conjunto de apreciação da cor é considerado fundamental, uma vez que é através da apreciação da cor que muitas vezes reconhecemos, adquirimos ou rejeitamos determinados produtos, sejam eles alimentares ou cosméticos. De maneira a que determinados alimentos sejam mais atrativos, recorre-se ao uso de corantes, caso os mesmos não tenham cores muito apelativas, o que promove a aquisição destes produtos, pois o contacto inicial que temos com qualquer produto é o visual e, aí, a cor tem um grande impacto. Para nós, consumidores, a vivacidade das cores num alimento, transmite-nos a sensação do sabor e até de uma qualidade superior. (42,43,54,55)

A fim de tornar possível um controlo de qualidade por parte da União Europeia, existem normas a cumprir no que toca ao uso de corantes. Novas técnicas analíticas têm sido desenvolvidas para a quantificação de corantes em diversas matrizes, incluindo os corantes bixina e norbixina. (56,57)

Visto ser um corante com um preço muito acessível em relação aos corantes artificiais, a bixina tem-se tornado muito conveniente, e tem sido substituído dos corantes sintéticos. Como consequência da averiguação do impacto negativo dos corantes sintéticos, as indústrias procuram cada vez mais corantes naturais e mais baratos. O corante extraído do urucum, a bixina, foi aprovado pela Food Agriculture Organization (FAO) para o seu uso em alimentos, no entanto, a sua utilização depende de país para país. (58)

Contudo, o urucum é mundialmente empregado como corante para diversos fins, principalmente na indústria alimentar, nomeadamente, queijos, manteiga, doces, bebidas, pudins, entre outros. Estas formulações de extrato de urucum são feitas para dar tons de cor amarelo-alaranjado a baixas temperaturas para alimentos processados, sendo estável por um período de 2 meses. (3,59)

Na União Europeia não é permitida a utilização do urucum como especiaria. O urucum também começou a ser adicionado às sementes constituintes das rações para os animais, não só por ser nutritivo, mas porque dava cor à mesma. (60–62)

Desde a proibição por parte da União Europeia dos corantes alimentares artificiais, por possíveis efeitos cancerígenos, que o urucum é importado de maneira intensa da América tropical e da África. (3,9,15)

8.2. Uso cosmético de *Bixa orellana*

Está a aumentar o uso de urucum em produtos cosméticos, uma vez que as suas propriedades previnem queimaduras solares, por causa da existência de tocotrienóis na sua composição, que facultam um efeito protetor ao queratinócitos de malefícios originados pelos raios UV do tipo B. (42,59)

Em relação ao extrato oleoso é um emoliente, com alto teor de carotenoides na sua constituição que proporcionam benefícios antioxidantes aos artigos de cosmética, e que ainda promovem uma intensificação da cor. É muito apreciado para o uso em protetores solares, produtos bronzeadores e até mesmo para o favorecimento da tonalidade de batons. (10,63,64)

Porém, as mulheres de origem indiana que casavam em cultos usavam o urucum, uma vez que o mesmo era um corante natural e não trazia malefícios, ao contrário de outros, como era o caso do “sindoor” (símbolo avermelhado tradicional da Índia, usado pelas mulheres casadas e que é constituído por açafrão e mercúrio), que com um uso mais intensivo, poderia causar edemas e queda de cabelo. (65)

Os Índios americanos usavam desde há muito o urucum, não só para fins estéticos, mas também como forma de proteção solar e como repelente de insetos como já foi referenciado anteriormente. Seguindo a legislação da EU pode ser utilizado o urucum como corante. (14)

9. Legislação

No início do século XX, o urucum era usado ilegalmente para corar o leite, sendo divulgado pelo laboratório britânico Public Analyst. (49) Atualmente, o urucum pode ser utilizado na coloração de alguns queijos e margarinas, no entanto, não pode ser utilizado para fazer coloração de manteigas, creme e leite, segundo a Diretiva 95/45/CE da Comissão, de 26 de Julho de 1995, que estabelece os critérios de pureza específicos dos corantes que podem ser utilizados nos géneros alimentícios. (49,66)

De acordo com o artigo presente da legislação 94/36/CE, é autorizado o uso de urucum, bixina e norbixina, como corante para o uso em alimentos. O uso do urucum, entre outros corantes, segundo a legislação da União Europeia não é permitido nas especiarias. No entanto, pode ser utilizado para produtos alimentícios e cereais. O Programa de alimentos importados do Reino Unido (Food Standards Agency), fez uma análise em 893 amostras, através da qual, foi detetado o corante bixina em 18 amostras. Entre estas amostras estavam óleos, molhos e especiarias. Dada esta situação foi criado um alerta para RASFF da Europa (Rapid Alert System for Food and Feed). Devido à presença não permitida tanto da bixina, como da norbixina em óleo de palma e pimenta, houve uma alteração relativamente à indústria de alimentos. Logo depois desta situação, a comissão da União Europeia para clarificar esta matéria do que seria legal e do que não seria legal, realizou uma lista dos produtos alimentares que poderiam utilizar o corante urucum, bixina e norbixina, no sentido de não se repetir o mesmo procedimento, e ficando assim mais clarificado em que situações poderão ser utilizados estes corantes, pois a União Europeia tem uma legislação diferente de corantes relativamente aos restantes países. (49,66)

Segundo a legislação da comissão da união europeia – CEE (Comunidade Económica Europeia), o urucum encontra-se classificado sob n.º E160b e CI Natural Color 4. (49,67,68) O urucum encontra-se listado no Food Chemical Codex dos USA, referência nº73.30, 73.1030 e 73.2030, e encontra-se na listagem do GRAS (Generally Recommended As Safe), permitido a utilização em produtos alimentícios para consumo humano. (69)

O urucum é um corante que é permitido e utilizado mundialmente por ser um corante natural. Devido às limitações da utilização dos corantes sintéticos, o urucum surge

como uma boa alternativa devido a ser um corante natural podendo ser utilizado nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas. Contudo, existem algumas (poucas) limitações ao seu uso, dependendo da legislação e do produto, cada país tem os seus limites máximos de utilização, dependendo da natureza do alimento, podendo ou não ser utilizado como uma especiaria. (49)

Em suma, a Food Agriculture Organization (FAO) debate sobre a legislação para a prática de corantes naturais, relativamente à adoção de corantes e diversos outros aditivos alimentares. Assim como a organização JECFA (Joint Expert on Food Additives), realizou um conjunto de pormenorizações de identidade e pureza, relativamente aos procedimentos a serem analisados na realização das avaliações toxicológicas e estudos. (70)

10. Toxicidade

Podem considerar-se três grupos de corantes naturais que são os seguintes: (71)

- a) Corante isolado quimicamente inalterado de um alimento, e usado no mesmo tipo de alimento em níveis normalmente encontrados nesses alimentos. Este corante é aceite como se fosse o alimento, não sendo necessários dados toxicológicos;
- b) Corante isolado quimicamente inalterado de um alimento, e usado no mesmo tipo de alimento em níveis superiores aos normalmente encontrados nesses alimentos ou usados em outros alimentos. Este corante deve ser avaliado toxicologicamente como se fosse corante artificial;
- c) corante isolado de um alimento, porém, quimicamente modificado durante a sua obtenção ou extraído de outra fonte não alimentar. Este corante deve ser avaliado toxicologicamente como se fosse corante artificial.

De acordo com a legislação atual, o urucum encontra-se classificado na linha a). (22)

Nas averiguações feitas na Holanda com ratos e suínos, relativamente a toxicidade do urucum, verificou-se que o corante não apresentava toxicidade, podendo ser utilizado como um corante natural e seguro, para dar coloração às margarinas, queijos e outros produtos.

Foi permitido desde 1970 pelo FAO/OMS, que a ingestão diária seria de 1,25 mg/kg. (22,58) Urucum não é genotóxico nem apresenta toxicidade crónica e toxicidade subaguda e carcinogenicidade. A norbixina (derivado da bixina), após 24 horas da ingestão de bixina não era detetado no plasma em humanos voluntários. (34,72,73)

11. *Bixa orellana* como planta medicinal

O uso das plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Tendo em conta a opinião pública face à utilização e à eficiência de plantas medicinais, começou a existir uma ideia mais clara face os seus efeitos benéficos, sem existir o conhecimento profundo da sua constituição, composição química e propriedades. Assim, o conhecimento popular teve um impacto positivo na propagação da ação terapêutica de determinadas plantas. Os consumidores de plantas, para fins medicinais, continuam a manter ativo o uso de produtos naturais à base de plantas, fazendo com que sejam válidas as informações terapêuticas acumuladas com o passar dos anos. (34)

Aproximadamente 80% dos fármacos eram produtos naturais ou inspirados nesses produtos. São exemplos a vincristina, a colchicina, a atropina e até mesmo a morfina. (74)

O estudo de plantas para fins medicinais tinha por base, até há pouco tempo, ensaios de triagem farmacológicos e biológicos. Hoje em dia, esse mesmo estudo tem obtido algum desenvolvimento, uma vez que são realizados a níveis farmacodinâmicos e farmacocinéticos. As provas de triagem englobam pesquisa molecular. (13)

B. orellana é usada na medicina tradicional, dando origem a alguns fármacos destinados ao tratamento de várias doenças. Os extratos de urucum das folhas, raízes e sementes têm sido tradicionalmente utilizados para fins medicinais pelos índios da América do Sul; o pericarpo do urucum que envolve a semente é bastante utilizado na fitoterapia, no tratamento da disenteria, da gonorreia, da febre, da obstipação e como antipirético. (9,60,75,76)

A infusão das folhas da *B. orellana* é utilizada pela medicina tradicional para o tratamento de azia, vômitos, náuseas, problemas estomacais, assim como problemas na próstata, bronquite, dor de garganta, inflamação, diurético leve, e laxante.

A infusão é feita a frio e poderá ainda ser utilizada para a inflamação dos olhos, para o tratamento de problemas de pele, disenteria, febres e hepatite, bem como para ser usado como anti-séptico, afrodisíaco e adstringente, realiza-se uma infusão com brotos mais jovens das folhas. Esta terapia medicinal é usada pela tribo Piura das florestas tropicais da Amazónia. (9,77)

A fitoterapia peruana utiliza as folhas para tratar de hipertensão arterial, hipercolesterolemia, obesidade, cistite e insuficiência renal. As folhas têm também sido descritas na eliminação do ácido úrico. (9)

Os extratos da folha, raízes e casca da *B. orellana* são utilizados como antídoto para o envenenamento de *Jatropha curcas* L. e *Hura Crepitans* L. (60) As sementes de urucum têm a capacidade de neutralizar o ácido cianídrico presente em *Manihot esculenta* Crantz (mandioca), que é uma espécie cianogénica. As sementes têm também sido usadas como cardiotónico, hipotensor, expectorante, antibiótico, anti-Leishmania e antimalárica. Estudos têm também revelado ação citotóxica, particularmente contra células A549 (carcinoma do pulmão). (9,59,78,79)

A pasta de sementes é indicada como afrodisíaco e na proteção contra picadas de insetos e em xarope contra faringite e bronquite. As sementes também são recomendadas em casos de muco intestinal, sarampo e como emenagoga. (80) Aplicado como tinta corporal, absorve a luz ultravioleta e repele mosquitos e moscas. A pasta de urucum filtra os raios ultravioletas da luz do sol, protegendo a pele contra queimaduras excessivas. Os extratos das sementes *Bixa orellana* apresentam atividade anti-Leishmania. (37,81,82)

A seiva da cápsula de urucum também foi usada para tratar diabetes mellitus tipo II e infecções fúngicas. Foi tomada oralmente uma decocção de sementes maceradas para aliviar a febre, e a polpa que envolve a semente feita em uma bebida adstringente usada para tratar disenteria e infecção renal. (37)

Os extratos de raízes inteiras foram relatados como tendo atividade espasmolítica. (83) A preparação de folhas e raízes tem sido usada no tratamento de diabetes, icterícia e hipertensão. Este tratamento é utilizado em Trinidad e Tobago, também se utiliza para o

tratamento de Leishmaniose e na mordedura de cobras como neutralizador do veneno de cobra e de outros efeitos colaterais associados. (60,77)

Estudos revelaram que os extratos da *B. orellana* têm atividades anti-helmíntica, anti-plaquetária, antiagregante e anti-protozoária. (10,84)

O urucum foi empregado pelos índios do Peru para fins medicinais para tratar a insolação, amigdalite, queimaduras, lepra, pleurisia, apneia, desconforto retal, antisspético vaginal e dores de cabeça. (37)

As sementes, sendo ligeiramente adstringentes e em decocção, eram um remédio muito usado para tratar a gonorreia. No Uruguai, a polpa moída das sementes, se aplicado imediatamente a queimaduras, servia para prevenir a formação de bolhas ou cicatrizes. A polpa foi também prescrita para dor de estômago. Nas Filipinas, uma decocção da casca foi utilizada em picos febris. Na Guiana Francesa, uma infusão foi prescrita como um purgativo na disenteria. Foi tomada oralmente uma decocção de raiz para controlar a asma. Oligúria e icterícia foram tratadas com chás de raiz; infusões de raiz em água e rum foram usados para tratar doenças venéreas. (37)

12. Princípios terapêuticos

Para se avaliar as propriedades farmacológicas (neuro-farmacológicos, analgésica, anti-convulsionante, antidiarreica e avaliação na motilidade gastrointestinal) e de toxicidade de *B. orellana*, têm sido usados vários modelos animais, nomeadamente roedores. (85)

12.1. Teste de toxicidade aguda

Antes de se iniciar qualquer ensaio *in vivo* para determinar atividades biológicas são geralmente efetuados ensaios de toxicidade.

Não existiu nenhum estudo que tivesse como objetivo avaliar a toxicidade aguda (LD₅₀) (*Lethal Dose* 50) de qualquer um dos extratos e não tem sido descrito nenhum estudo de toxicidade a longo prazo. Os teores de alcaloides, saponinas e de glicósidos cardiotónicos nos vários extratos de folha da *B. orellana* aparentam ser bastante baixos. (60)

Passa-se a descrever um ensaio de toxicidade levado a cabo por Koster. [88] Ratos albinos suíços com um peso de 20-25 g de ambos os sexos foram divididos em grupos de 6 no qual foram administradas diferentes doses de extrato bruto de *B. orellana* (62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 e 4000 mg/kg (v.o.). No ensaio, o grupo de controlo teve como veículo Tween 80 a 1% em água (v.o.). Ao fim de 24 horas, os sintomas e sinais gerais de toxicidade foram observados, e ao fim deste período foram mortos. (85)

No final, os autores verificaram a ausência de efeitos letais ao fim das 24 horas após a administração do extrato de folhas de *B. orellana*, em qualquer uma das doses que foram usadas, mesmo com a dose mais elevada testada que foi de 4000 mg/kg. Por consequência, não foi possível determinar a dose letal (*Lethal Dose 50*) do extrato para os ratos. As doses de 125, 250 e 500 mg/kg de peso corporal foram os selecionados por vários autores para a triagem farmacológica que se descreve a seguir. (85)

12.2. Avaliação do efeito de pentobarbitona na indução do sono

O teste hipnótico induzido por pentobarbitona foi utilizado seguindo o método descrito por Ramirez. (86) Neste ensaio, os animais foram divididos ao acaso em 3 grupos: controlo, controlo positivo e teste de grupo, sendo que cada um era constituído por 6 ratos. Foi administrado no grupo de controlo o extrato bruto nas seguintes doses: 125, 250 e 500 mg/kg (v.o.). No grupo de controlo positivo foi administrado diazepam 1 mg/kg (i.p.). Já o grupo de controlo recebeu como veículo a 1% Tween 80 em água na dose de 10 ml/kg (v.o.). Após trinta minutos e de forma a induzir o sono foi administrado em cada rato pentobarbital a 50 mg/kg (i.p.). Os ratos foram observados durante o período de latência (tempo entre a administração do pentobarbital e o início da sonolência), assim como a duração do sono, ou seja, o tempo entre a perda e a recuperação do reflexo. (10,85)

Foi possível concluir que o extrato de folhas de *Bixa orellana* reduz expressivamente o tempo de início do sono, relativamente ao controlo, com resultados estatisticamente significativos (unicamente nos níveis de dose de 500 mg/kg). Averiguou-se também que o extrato aumenta a duração do sono nos animais de teste, comparativamente com o controlo com dados estatísticos significativos nos grupos com dose de 250 e 500 mg/kg. (85)

12.3. Atividade neurofarmacológica

Num ensaio de hipnose com um extrato das folhas de *Bixa orellana*, após administração de pentobarbitona reparou-se que com uma dose de 500 mg/kg do extrato de *B. orellana* diminuía o tempo de início do sono e que com uma dose entre 250 e 500 mg/kg aumentava o tempo total de sono dos animais, por se verificar um decréscimo na atividade locomotora. (10,34)

12.4. Avaliação da atividade anticonvulsiva

Foi administrado no grupo de controlo o veículo Tween 80 a 1% em água a dose de 10 ml/kg (v.o.), enquanto que no teste de grupo foram administrados extratos nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (v.o.). Esta administração ocorre 45 minutos antes da injeção de estriçnina (i.p) (2 mg/kg). Este teste de atividade anticonvulsivante foi baseada no método escrito por Gupta. (87) Neste ensaio houve um aumento médio de sobrevivência dos animais testados com 250 e 500 mg/kg. (60,85)

12.5. Avaliação da atividade analgésica

Tendo por base o método de Koster, foi efetuado um ensaio de contorção com administração de ácido acético. (88) O extrato bruto de *B. orellana* com doses de 125, 250 e 500 mg/kg foi administrado via oral aos 6 ratos, 45 minutos antes da injeção (i.p) de ácido acético a 0,6% (v/v) numa dose de 10 ml/kg, enquanto que o veículo 1% Tween 80 em água foi utilizada como tratamento de controlo. No entanto, foi administrado no grupo de controlo ácido acetilsalicílico, na dose de 100 mg/kg (v.o.). Posteriormente a um intervalo de 5 minutos para a absorção adequada do ácido acético, foram observadas as contrações específicas do corpo dos animais nos quais foram registadas durante 15 minutos. Em suma, após a administração do extrato metanólico das folhas de *B. orellana* e através do teste de contorção, os ratos mostraram um reflexo de contorção reduzido induzido pelo ácido acético. (85)

12.6. Avaliação da atividade antidiarreica

Neste ensaio, com base no procedimento descrito por Abdullahi, a atividade diarreica foi induzida pelo óleo de rícino. (89) Os ratos foram divididos em 3 grupos: controlo, controlo positivo e grupo teste (sendo cada grupo constituído por 6 ratos). No entanto, o grupo de controlo recebeu como veículo Tween 80 a 1% em água numa dose de 10 ml/kg (v.o.). Foi administrado loperamida no grupo de controlo positivo numa dose de 3 mg/kg (v.o.). No grupo teste foi administrado o extrato bruto com doses de 125, 250 e 500 mg/kg v.o. Esta administração foi realizada 30 minutos antes da administração oral do óleo de rícino, tendo um efeito laxante após uma administração de 0,5 ml em cada rato. Cada rato foi colocado numa gaiola individual. O chão da gaiola encontrava-se forrado com papel e o mesmo era mudado de hora a hora. O número total de fezes diarreicas e não diarreicas segregadas pelos animais foi registado num período de análise de 4 horas. Tendo em conta a solidez das fezes foi feita a seguinte escala: fezes normais = 1; fezes semi-sólidas = 2; e fezes aquosas = 3. (85) Nos ratos onde foi administrado extrato de folhas de *B. orellana*, estes apresentaram um decréscimo significativo do número total de fezes. (85)

Num determinado ensaio clínico com doentes com hiperplasia benigna da próstata (HBP), 2 dos 68 doentes sujeitos ao tratamento com *B. orellana* apresentaram obstipação. (90)

12.7. Motilidade gastrointestinal

Foi adotado um método de forma a avaliar o efeito do extrato bruto de metanol em relação ao sistema gastrointestinal dos ratos. Os animais teste estiveram sem alimento durante 24 horas, tendo apenas acesso a água. Foram divididos em grupos de teste, grupo de controlo, controlo positivo, sendo que cada grupo foi constituído por 6 ratos. Os grupos de teste receberam extrato bruto nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (p.o.). O grupo de controlo recebeu veículo Tween 80 a 1% em água numa dose de 10 ml/kg (p.o.). Já o grupo de controlo positivo recebeu sulfato de atropina na dose de 0,1 mg/kg (i.p.). Passados 30 minutos, todos os ratos foram alimentados com 1 ml de farelo de carvão (3% de suspensão de carvão vegetal em metilcelulose aquosa a 0,5%). No final, todos os ratos foram sacrificados. Foi medido o comprimento do intestino (esfíncter pilórico ao ceco), e a

distância percorrida pelo carvão. O movimento do carvão ao longo do intestino foi apresentado na forma de percentagem. Verificou-se que as folhas de *B. orellana* reduziram a motilidade intestinal estatisticamente significativa para a concentração 500 mg/kg de extrato bruto de *B. orellana*. (85)

12.8. Atividade antimicrobiana

Tendo como base estudos *in vitro*, e utilizando várias partes da planta, foi possível reparar que a *B. orellana* apresentou características antibacterianas. (26,85,91)

No ensaio realizado, ainda *in vitro*, foi possível observar-se que vários extratos do urucum apresentaram um comportamento inibitório face às seguintes bactérias: *Clostridium perfringens*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Paenibacillus polymyxa*, *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus durans*. (91)

Outros estudos revelaram que extratos de folhas de *B. orellana* também apresentavam atividade antifúngica para além de atividade antibacteriana. Verificou-se que os primeiros estudos demonstraram que um extrato etanólico apresentou atividade antimicrobiana contra espécies de *Bacillus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* (Gram-positivo), existindo uma menor atividade contra *Escherichia coli* (Gram-negativo), e os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. (26,92,93,101)

Mais recentemente, foi mostrado que os extractos hidroalcoólicos liofilizados das folhas da *B. orellana* exibiram uma actividade inibidora relevante contra *P. aeruginosa* e *Proteus mirabilis*, com actividade intermédia contra *Bacillus cereus* e *S. aureus*, e menor actividade contra *Salmonella typhimurium*. O extrato demonstrou pouca actividade contra *Mycobacterium tuberculosis*. (94)

Um extrato aquoso de folhas de *B. orellana* mostrou ter boa actividade antimicrobiana contra as espécies *Streptococcus* e *Shigella dysenteriae*. Exibiu uma actividade modesta contra *E. coli*. (95)

Extratos metanólicos de folhas de *Bixa orellana* exibiram uma atividade inibidora considerável contra uma diversidade de fungos e bactérias, sendo que a atividade mais acentuada foi contra *Salmonella typhi*, espécies *Acinetobacter*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. (96) As atividades antimicrobianas de extratos alcoólicos de *B. orellana* determinaram uma atividade inibidora contra *Bacillus cereus* e *P. aeruginosa*. (97)

12.9. Atividade anti-inflamatória

Foi estudado o efeito anti-inflamatório de um extrato aquoso de folhas de *Bixa orellana*. (98) No estudo, a inflamação foi induzida em ratos (patas) através da administração de carragenina (polissacarídeos obtidos a partir de extratos de algas marinhas), histamina, serotonina e bradicinina, reações estas que foram inibidas pela administração oral de 50 mg/kg e 150 mg/kg de extrato de folha de *B. orellana* aos 30 min após-indução de bradicinina. A inibição significativa da inflamação crónica foi também verificada pela administração oral diária de 150 mg/kg do extrato da folha de *B. orellana*. Com um extrato aquoso liofilizado extraído das folhas de *B. orellana* é possível inibir a inflamação criada pela administração de bradicinina, que foi confirmada por Keong. (99)

Os indicadores de existência de inflamação foram um edema induzida pela bradicinina na pata do rato e a permeabilidade vascular peritoneal. A administração do extrato da folha de *B. orellana* nas concentrações 50 mg/kg e 150 mg/kg suprimiu de forma significativa os marcadores inflamatórios. O extrato de *B. orellana* diminuiu a produção de monóxido de azoto, indiciando que o efeito anti-inflamatório pode estar associado a uma redução nas espécies reativas de oxigénio. (99)

12.10. Anti-ulceroso

Na avaliação da capacidade anti-ulcerosa de *B. orellana*, os autores usaram 64 ratos Wistar. Após a úlcera ter sido provocada, nos 3 dias posteriores, aos animais foi-lhes administrado meperidina (2mg/kg) por uma injeção na cavidade peritoneal de forma a reduzir a dor e tornar mais fácil a sua nutrição. (3)

Os ratos foram divididos de forma aleatória em 8 grupos, nos quais 4 grupos foram tratados através uma solução bixina e outros 4 foram tratados com a solução salina. (76)

Os animais foram mortos em períodos de 2, 7, 14 e 21 dias após o início do tratamento, quatro grupos são grupos controlo aos quais foram feitas aplicações tópicas de solução de DMSO numa dose (50 µL), por minuto em todas as áreas lesionadas, apenas uma vez por dia, sempre ao mesmo tempo. Os outros quatro grupos experimentais receberam administrações tópicas diárias de solução de bixina (bixina foi diluída em dimetilsulfóxido com uma concentração de 3mg/mL) e DMSO numa dose (50 µL) por minuto em todas as áreas lesadas. Os ratos de cada grupo (grupo de controlo e grupo experimental) foram sujeitos ao protocolo de *overdose* com tiopental sódico, através de uma injeção intraperitoneal, nos intervalos de tempo mencionados anteriormente. Os animais foram mortos e os tecidos estudados. Os tecidos foram corados com eosina/hematoxilina e vermelho de picro-sirius. (100)

No dia 2 de tratamento no grupo de controlo, foi observada uma área de úlcera coberta por uma membrana purulenta de fibrina. O tecido de granulação pode ser identificado numa porção profunda da úlcera que apresentava uma inflamação intensiva com predomínio de neutrófilos, edema grave e vasos sanguíneos. O grupo experimental mostrou um número menor de neutrófilos. (100)

Nestas análises histológicas, puderam ser observados fibroblastos, reepitelização e a contração da ferida, bem como a quantificação de plasmócitos, neutrófilos, macrófagos, colágeno maduro e imaturo e linfócitos. (100)

No dia 7, foi observada a presença de ulceração coberta por uma fibrina membrana purulenta, no entanto, não está na sua completa reepitelização da lesão. No tecido de granulação, pode ser observada a redução do número de neutrófilos e a presença de macrófagos, linfócitos e células plasmáticas, aumentando deste modo o número de vasos sanguíneos e a proliferação de fibroblastos quando comparado ao grupo de controlo no dia. As fibras de colagénio eram escassas e desorganizadas, e apresentaram um aspeto não homogéneo. No grupo experimental, todos os casos apresentaram reepitelização, com uma redução na área da lesão e foi identificado uma ligeira inflamação crónica.

Contudo, foi encontrada uma maior quantidade de fibroblastos com uma maior deposição de fibras de colagénio. (100)

Foi observada em todos os períodos uma diminuição no número médio de neutrófilos no grupo experimental, em relação ao grupo controlo. Em dois dias, o total da área de colagénio era maior no grupo experimental, do que no grupo controlo. A deposição de colagénio maduro, no 14º dia, foi maior no grupo experimental do que no grupo controlo. (100)

No dia 14 de tratamento, o epitélio tinha sido completamente restabelecido em ambos os grupos. No grupo de controlo, o tecido conjuntivo subjacente à área ulcerada ainda apresentava um estado crónico de inflamação, com dispersão de células mononucleares e presença de fibroblastos, apresentando fibras de colagénio desorganizadas e vasos sanguíneos. No grupo experimental, a organização do colagénio foi mais evidente, com fibras mais espessas e coesas, mostrando uma melhor organização quando comparado ao grupo controlo. Foi observada novamente, uma pequena área de lesão.

Após 21 dias de tratamento, as características histológicas provaram ser bastante semelhantes comparativamente ao grupo experimental e para o grupo controlo. A reepitelização foi completa. (100)

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a solução de bixina elimina a inflamação aguda e acelera a reepitelização, contração da ferida e maturação do colagénio. Em suma, esta solução de *B. orellana* é importante para o tratamento de úlceras, uma vez que demonstrou uma boa resposta face a estes aspetos. (100)

Uma vez que existiu uma redução de neutrófilos presentes no grupo experimental, após os resultados obtidos neste estudo é possível entender a necessidade de estudos adicionais relativamente às ações da bixina na modulação de neutrófilos. (100)

12.11. Cancro da próstata

Foi conduzido um ensaio clínico de 12 meses em dupla ocultação, randomizado, verificado por placebo onde foi administrada uma preparação de folhas liofilizadas da *B. orellana* a homens com sintomas do trato urinário menores. Os grupos placebo e tratados incluíam 68 participantes. Os sujeitos tratados consumiam 250 mg cápsula do pó de folha, três vezes ao dia. Não foram constatadas diferenças no que diz respeito à melhoria clínica entre os grupos tratados e placebo, e a proporção de efeitos adversos foi idêntica. (90)

A falta de efeito pode ter várias causas. Foi utilizada uma dose consideravelmente baixa de constituintes ativos, e foi utilizada uma folha inteira em pó. Estudos de animais mostraram que doses de extratos superiores a 3000 mg de dose humana ou equivalente produzem efeitos farmacológicos. Sensivelmente apenas 30% do material vegetal é constituído pelos princípios ativos, indicando que a dose diária utilizada neste estudo foi equivalente a cerca de 250 mg, uma dose que pode ter sido demasiado baixa para o efeito pretendido. (37,90)

12.12. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante e anti-radicalar dos extratos das folhas de *B. orellana* também foram estudadas por diversos grupos de investigadores que demonstraram que os extratos etanólicos de folhas da *B. orellana* apresentaram uma atividade antioxidante considerável baseada em cinco sistemas de ensaio diferentes. Foi descoberto que os extratos etanólicos de *B. orellana* preveniam e diminuían a peroxidação de lípidos induzida por radicais livres, aumentavam a atividade da catalase, mas reduziam os níveis séricos de glutathiona em ratos tratados com tetracloreto de carbono. (95,97,101)

Um extrato metanólico de folhas da *Bixa orellana* foi utilizado de forma a fornecer hepatoproteção ao tetracloreto de carbono administrado a ratos. Uma dose na quantidade de 500 mg/kg de peso corporal, do extrato, quando administrado três vezes por dia diminuiu os níveis da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e colesterol em 52%, 57% e 53%, respetivamente, induzida pelo tetracloreto de carbono.

Estes resultados foram suportados por análise histopatológica dos tecidos hepáticos. (60,102)

12.13. Atividade hipoglicémico

O urucum reduz a glicose plasmática dos cães e dos ratos onde foram feitos estudos, bem como dos níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade), o colesterol total, eleva o HDL (colesterol de alta densidade), indicando então um efeito hipocolesterolémico. (103–105)

Quando administrado 15 minutos antes da carga de glicose, o extrato metanólico produziu uma redução de cerca de 19% nos níveis de glicose plasmático. Um extrato aquoso da *B. orellana* foi administrado aos ratos 45 minutos antes de uma dose de glicose ser administrada e verificou-se uma diminuição dos níveis de glicose em cerca de 30%. A dosagem foi de 520 mg/kg. Num estudo *in vitro*, um extrato metanólico de folhas da *B. orellana* apresentou atividade inibidora da atividade da α -amilase, ação esta que retardaria a absorção de glicose no trato gastrointestinal. (99,106)

12.14. Atividade diurética

Para avaliar a atividade diurética *in vivo* de *B. orellana*, foram utilizados ratos Wistar que foram divididos em 8 grupos de 6 elementos. Todos os animais ficaram sem comida e água 16 horas antes da experiência. Antes da administração oral de drogas para ensaio, em cada animal foi-lhes administrada uma quantidade de 25 ml/kg de soro fisiológico. Entre os 8 grupos de animais, o 1º grupo recebeu o óleo de amendoim como controlo e o veículo para os extratos e o 2º grupo recebeu a furosemida 20 mg/kg. Cada extrato foi analisado em duas concentrações distintas. Desde o 3º grupo até ao 8º grupo, foram administrados extratos metanólicos (250 e 500 mg/kg), extratos obtidos com éter de petróleo (250 e 500 mg/kg) e um extrato aquoso (250 e 500 mg/kg). Os ratos usados eram saudáveis, dos dois sexos, aproximadamente com a mesma idade e pesando cerca de 150-180 g. Foram alimentados com a dieta Chow (padrão) e água (*ad libitum*). Os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno preservadas em condições de ambiente padrão, ou seja, 12

horas de luz e 12 horas em ciclo escuro, 25 ± 3 ° c e 35-60% de humidade relativa. Os resultados alcançados demonstraram que o extrato metanólico revelou uma atividade diurética notável com uma quantidade de 500 mg/kg, aumentando deste modo o volume total de urina, assim como os níveis de sódio, cloreto e potássio. (107)

13. Precauções/Contra-indicações/Efeitos adversos

A Tabela 4 compila as contra-indicações e efeitos adversos de *B. orellana*.

Tabela 4 - Contra-indicações/ Efeitos adversos

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Evitar a utilização de sementes da <i>Bixa orellana</i>, constituintes de <i>Bixa orellana</i>, ou de qualquer membro da família <i>Bixaceae</i>, em indivíduos alérgicos ou hipersensíveis aos constituintes da planta. O corante do urucum pode conter proteínas das sementes contaminantes ou residuais, às quais o doente pode ter desenvolvido hipersensibilidade (IgE). Este corante é uma causa rara de anafilaxia. (108,109) |
| <ul style="list-style-type: none">• Num caso que foi conhecido, urucum provocou anafilaxia com alguns sintomas, dos quais: urticária, angioedema, e hipotensão severa. Todos estes sintomas surgiram após 20 min da ingestão de leite e fibras de cereal, que continham o corante urucum. (108) <p>De acordo com a opinião de um especialista, o urucum pode ser classificado como sendo pouco alérgico, tendo em conta o seu longo uso principalmente como um aditivo alimentar. (109,110)</p> |
| <ul style="list-style-type: none">• Existe um relato de um homem de 58 anos que experimentou anafilaxia após a ingestão de urucum num produto de queijo. Após o sucedido o mesmo sofreu quatro episódios de anafilaxia severa com urticária e angioedema. (111) |
| <ul style="list-style-type: none">• Dermatológico: Existem relatos de casos de reações adversas associadas à utilização do corante do urucum em produtos alimentícios: urticária e angioedema, e em alguns casos também eczema. (108,111) |

- Cardiovascular: O urucum traz benefícios ao nível cardiovascular, uma vez que baixa a pressão arterial. Relatos de efeitos adversos associados ao corante do urucum, incluíram hipotensão grave e angioedema. (108)
- Endócrino: Tendo por base os estudos em animais, o urucum pode influenciar os níveis glicémicos e de insulina. (103,112) Em alguns casos foram relatados, após o uso de pigmentos de urucum, casos de hiperinsulinemia.
- Hepática: Num ensaio realizado em cães, a administração do urucum induziu hiperglicemia, ao mesmo tempo que provocou danos nas mitocôndrias, no retículo endoplasmático, e maioritariamente no fígado e no pâncreas. (113)
- Gastrintestinal: Num ensaio clínico, 68 pacientes com HBP e com sintomas moderados do trato urinário inferior, quando usaram a *Bixa orellana* queixaram-se de obstipação. (90)
- Utilizado de forma cuidadosa em doentes nos quais foram administrados agentes mutagénicos, como é o caso da ciclofosfamida. O urucum não tem atividade mutagénica nem inibidora de mutações induzidas, no entanto deve ser utilizado com precaução, pois altas doses podem aumentar o efeito de um mutagénico. (114)
- Utilizar cuidadosamente em doentes que utilizem substratos do citocromo P450 1A ou 2B, uma vez que, em estudos em *in vitro* e em animais, o urucum induziu estas isoenzimas. (116)
- O urucum, pode potencializar os efeitos dos medicamentos anti-hipertensivos. (10)
- O urucum pode ter efeitos diuréticos, podendo aumentar o risco de desequilíbrio eletrolítico. (103)
- Usar de forma cuidadosa em doentes com historial de obstipação ou os que recorram a laxante. Tendo por base o estudo feito em animais, urucum pode ter uma atividade antidiarreica e contrariar esses efeitos. (85)
- Utilizar com precaução em doentes com diabetes, ou que utilizem agentes antidiabéticos, uma vez que, estudos em animais, demonstraram que o urucum

pode alterar os níveis de glicose e insulina. (103,104)

- Utilizar cuidadosamente em doentes que utilizem medicamentos administrados por via oral, pois um extrato metanólico de folhas de *Bixa orellana* reduziu a motilidade gastrointestinal em animais, podendo alterar a absorção de medicamentos administrados concomitantemente. (85)
- Evitar a utilização em mulheres grávidas ou a amamentar e em crianças com doses superiores às normalmente encontradas em alimentos. Existem dados clínicos humanos insuficientes para sustentar a sua segurança neste momento, embora estudos em animais, nomeadamente em ratos sugiram que o urucum não é tóxico para a mãe nem para o embrião. (73)
- Utilizar cuidadosamente em pacientes que usem depressores do SNC, pois, com base em estudos com animais, um extrato metanólico de folhas de *B. orellana* exerceu efeitos sedativos. (85)

O uso de *B. orellana* durante a gravidez e durante lactação não foi aprofundado em ensaios clínicos. No entanto, a *Bixa orellana* é considerada segura quando usada oralmente em quantidades, como as encontradas nos alimentos, devido à sua longa história de uso como aditivo alimentar. A utilização de quantidades medicinais de urucum durante a gravidez e durante lactação não é recomendada, uma vez que existe escassez de dados disponíveis.

Tendo por base os estudos em animais, doses de até 500 mg/kg de peso corporal administradas por gavagem durante 7 dias não tiveram efeitos adversos em mães ou em fetos. Não foi observado nenhum aumento na letalidade do embrião ou redução do peso corporal fetal em ratos expostos ao urucum. O urucum não causou um aumento na incidência de anomalias visíveis externamente, viscerais ou esqueléticas. Esses resultados sugerem que o urucum é seguro tanto para a mãe quanto para o embrião. Em suma, o NOAEL para toxicidade materna e para o desenvolvimento induzido pelo urucum foi igual ou superior a 500 mg/kg de peso corporal por dia (ou 140 mg de bixina/kg de peso corporal por dia) por via oral. (73)

14. Papel do farmacêutico

Ser farmacêutico é ser polivalente, ou seja, é uma profissão que pode ter vários tipos de funções: farmácia comunitária, farmácia hospitalar, indústria farmacêutica, análises clínicas ou dedicar-se à investigação. Assim, o farmacêutico pode ter um papel fundamental no que diz respeito à pesquisa sobre a *Bixa orellana L.*, uma vez que pode desenvolver os seus conhecimentos sobre os seus constituintes, nomeadamente se estão presentes ou se as quantidades são suficientes para exercer efeitos fisiológicos e farmacológicos. O farmacêutico pode desempenhar um papel crucial, tanto no desenvolvimento da aplicação como corante para a utilização em várias áreas, como nos alimentos a nível do desenvolvimento na indústria alimentar, analisar que tipo de toxicidade tem o corante, assim como a quantidade máxima em que pode ser utilizado e em que produtos pode ser aplicado. Relativamente à aplicação em cosméticos, os farmacêuticos têm um papel muito importante no desenvolvimento dos mesmos, podendo através do urucum, com pesquisas e análises experimentais mais profundas desenvolver novas aplicações. Porém, através do urucum já foram desenvolvidas várias aplicações: batons vermelhos, spray para bronzamento, entre outras. O farmacêutico tem o papel de garantir a qualidade e dosagem do produto definidas pela norma da EU, desenvolvendo deste modo controlo de qualidade.

Contudo, um farmacêutico que trabalhe no âmbito da investigação tem um papel essencial, pois pode desenvolver técnicas e experiências quer *in vitro* quer *in vivo* de modo a procurar novas atividades biológicas ou aprofundar as que têm sido relatadas até à data, confirmando ou não tais atributos. A investigação pode ainda levar ao conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos nas propriedades biológicas encontradas, bem como, ainda detetar possíveis interações medicamentosas, efeitos terapêuticos, toxicidade aguda (LD₅₀) e realizar um estudo de toxicidade a longo prazo. Não é um desenvolvimento fácil, porém possível, no entanto, o farmacêutico coadjuva numa área muito ampla como referido anteriormente, podendo assim desenvolver novas aplicações terapêuticas, explorar as interações medicamentosas, mecanismos de ação das mesmas e fontes de potencial de novos fármacos. O urucum apresenta um grande potencial não só para a indústria alimentar, cosmética como também a para a indústria farmacêutica.

15. Conclusão

Esta monografia possibilita aumentar o conhecimento sobre *Bixa orellana*, uma vez que em Portugal não é uma planta muito conhecida.

Os corantes da bixina e norbixina têm várias aplicações tecnológicas. Estas aplicações podem ser como corante, pelas indústrias alimentares, indústria farmacêutica, têxtil e de cosmética. No entanto, na indústria alimentar poderá ser utilizado como um antioxidante natural, proporcionando uma alternativa, como já foi referida anteriormente, de substituir e minimizar o uso de aditivos sintéticos. Contudo, nesta tese foi importante destacar que este tipo de corante na União Europeia tem algumas aplicações específicas dependendo de país para país. Uma das restrições na EU é o uso do corante como uma especiaria.

Estudos *in vivo* usando extratos de *Bixa orellana* compilados na presente monografia permitiu concluir que os mesmos têm diversas atividades biológicas: analgésico, atividade anticonvulsiva, atividade antidiarreica, efeito antimicrobiano, atividade anti-inflamatória, anti-úlceras, atividade antioxidante, atividade hipoglicémica, entre outras, que parecem confirmar a utilização da planta pelos indígenas desde há séculos.

Embora a exploração comercial do urucum esteja bem estabelecida, existem poucos estudos relativamente aos seus efeitos farmacológicos. Considerando a necessidade de desenvolver um produto seguro e eficaz, devem ser realizados mais estudos de forma a confirmar outras atividades biológicas apoiadas pelos usos populares da *Bixa orellana*. Ainda que presentes na medicina popular durante muitos anos, foram conduzidos poucos estudos, bem controlados, relativamente a animais e seres humanos. Em relação a estes estudos (animais e seres humanos) existem necessidades de segurança adicionais. São necessários também um maior número de detalhes químicos, de forma a que as relações entre a composição química e as ações fisiológicas e farmacológicas possam ser mais conhecidas, como mais estudos para identificar e quantificar todos os efeitos dos compostos presentes na planta e determinar a sua toxicidade.

16. Bibliografia

1. World Health Organization (1998) Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. In Essential Medicines and Health Products Information Portal. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jwhozip57e/6.html> (acedido em Abril 2018).
2. Hagiwara A, Imai N, Ichihara T, Sano M, Tamano S, Aoki H, Yasuhara K, Koda T, Nakamura M, Shirai T. A thirteenweek oral toxicity study of annatto extract (norbixin), a natural food color extracted from the seed coat of annatto (*Bixa orellana* L.), in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2003;41(8):1157–64. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691503001042>
3. Pérez HC, Sánchez GM. La *Bixa orellana* L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. *Revista Cuba de Farmácia*. 2010;44(2):231–244.
4. Freire J. Ligeiras informações sobre a cultura do urucum. Boletim do Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro. Vol. 25. 1936 [cited 2018 Aug 16]. 141-152p. Available from: <http://ourucum.blogspot.com/2014/>
5. Priya R, Siva R. Phylogenetic analysis and evolutionary studies of plant carotenoid cleavage dioxygenase gene. *Gene*. 2014;548(2):223–233. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111914008208>
6. Priya R, Siva R. Analysis of phylogenetic and functional diverge in plant nine-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Journal of Plant Research*. 2015 1;128(4):519–34. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10265-015-0726-7>
7. Pérez S, Cuen M, Becerra R. El Achiote. *Biodiversitas*. 2003;46:7-11.
8. Satyanarayana A, Prabhakara Rao PG, Rao DG. Chemistry, processing and toxicology of Annatto (*Bixa orellana* L.). *Journal of Food Science and Technology*. 2003;40(2):131–141.
9. Vilar DA, Vilar MS, Moura TF, Raffin FN, Oliveira MR, Franco CF, Athayde-Filho PF, Diniz MF, Barbosa-Filho JM. Traditional uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa orellana* L.: Review Article. *The Scientific World Journal*. 2014:1–11. Available from: http://gateway.webofknowledge.com/gateway/Gateway.cgi?GWVersion=2&SrcAuth=ORCID&SrcApp=OrcidOrg&DestLinkType=FullRecord&DestApp=WOS_CPL&KeyUT=WOS:000343498300001&KeyUID=WOS:000343498300001
10. Ulbricht C, Windsor RC, Brigham A, Bryan JK, Conquer J, Costa D, Giese N, Guilford J, Higdon ER, Holmes K, Isaac R, Jingst S, Kats J, Peery L, Rusie E, Savinainen A, Schoen T, Stock T, Tanguay-Colucci S, Weissner W. An evidence-based systematic review of annatto (*Bixa orellana* L.) by the natural standard research collaboration. *Journal Dietary Supplements*. 2012;9(1):57–77.
11. Rohde D, Silveira S, Vargas V. O uso do corante urucum (*Bixa orellana* L.) na técnica de coloração histológica. *RBAC*. 2006;38(2):119–21. Available from: https://sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_38_02/rbac3802_11.pdf

12. Skovgaard N. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. *International Journal of Food Microbiology*. 2000;62(1–2):165–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500004098>
13. Leal F, Clavijo CM. Annatto: Botany and Horticulture. In: *Horticultural reviews*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. 389–419p. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118100592.ch8>
14. Alves RR, Albuquerque UP. Ethnobiology and conservation: Why do we need a new journal? *Ethnobiology and Conservation*. 2012 20; Available from: <http://ethnobiococonservation.com/index.php/ebc/article/view/11/6>
15. Pinto AC. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. *Química Nova*. Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1995; 608–15 p.
16. Nabaida.K. Signos en la piel, Onoto. 2010. Available from: <http://kuainabaida.blogspot.com/2011/04/signos-en-la-piel-onoto.html>
17. Informações sobre o urucum (Information about annatto) | HISTÓRIA. Available from: <https://www.ourucum.com.br/historia>
18. Filgueiras TS, Peixoto AL. Flora e vegetação do Brasil na Carta de Caminha. *Acta Botanica Brasílica*. 2002;16(3):263–72. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010233062002000300003&lng=pt&tlng=pt
19. Chengaiah B, Rao KM, Kumar KM, Alagusundaram M, Chetty CM. Medicinal importance of natural dyes-a review. *International Journal of PharmTech Research*. 2010;2(1):144–54.
20. Miranda RM, Nery LA, Ventrella MC. Extrafloral nectaries of annatto (*Bixa orellana* L.): anatomy, nectar composition and activity during organ development. *Acta Botanica Brasílica*. 2017;31(3):468–76. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010233062017000300468&lng=en&tlng=en
21. Franco CF, Silva FC, Filho JC, Neto MB, José AR, Rebouças TN, Fontinelli IS. Etnobotânica e Taxonomia do Urucuzeiro. 2008; Available from: http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/UrucumTaxon/index.htm
22. Franco CF, Neto MB, Barros HM, Harder MN, Filho JC, Artur V, Ramires CM, Moraes AM. POR QUE URUCUM? 1ª edição. Pessoa J, editor. 2016. 145p.
23. Valério MA, Ramos MI, Braga Neto JA, Macedo ML. Annatto seed residue (*Bixa orellana* L.): nutritional quality. *Food Science and Technology*. 2015;35(2):326–30. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120612015000200326&lng=en&nrm=iso&tlng=en
24. Castro CB de, Martins CS, Falesi ÍC, Nazaré RF, Kato OR, Benchimol RL, Maués MM. A

- Cultura do Urucum. 2ª. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 61p.
25. Plantas FJA. Urucu m. 2007.
 26. Fleischer TC, Ameade EP, Mensah ML, Sawyer IK. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia*. 2003;74(1–2):136–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X02002897>
 27. Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, Instituto Plantarum; Vol. 1.4. Ed.2002. 74 p.
 28. Cruz JM, Gómez HB, Rodríguez CG, Berzunza EA, Hernández GC. *Agrobacterium*-mediated transient transformation of annatto (*Bixa orellana*) hypocotyls with the *gus* reporter gene. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 2003;73: 281–284.
 29. Madrid RR, Escobedo RM, Galera EB, Ku MV, Harries H. Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). *Scientia Horticulturae* (Amsterdam). 2006;109(2):165–72. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423806001403>
 30. Bonga J. Cell and Tissue Culture in Forestry - Clonal propagation of mature trees: Problems and possible solutions. Dordrecht; 1987. 249-271 p.
 31. Franclet A, Boulay M, Bekkaoui F, Fouret Y, Martouzet BV, Walker W. Rejuvenation. In: BONGA JM, DURZAN DJ. Cell and Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. 1987. 232-248 p.
 32. Pierik RL. Rejuvenation and micropropagation. In: Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. *Kluwer Academic Publishers*; 1990. 91–101 p.
 33. Akshatha V, Giridhar P, Ravishankar GA. Morphological diversity in *Bixa orellana* L. and variations in annatto pigment yield. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 2011;86(4):319–24. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14620316.2011.11512767>
 34. Venugopalan A, Giridhar P, Ravishankar GA. Food, Ethanobotanical and diversified applications of *Bixa orellana* L.: a scope for its improvement through biotechnological mediation. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*. 2011;1.
 35. Achote | HerbaZest. Available from: <https://www.herbazest.com/herbs/achote>
 36. Bilton P. Herbs: Annatto or Achote; History and Nutritional Value. Available from: <https://food.knoji.com/herbs-annatto-or-achote-history-and-nutritional-value/>
 37. Lim T. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Vol 1. Springer, editor. 2012. 515-526 p.
 38. Franco CF, Silva FC, Filho JC, Neto MB, José AR, Rebouças TN, Fontinelli IS. Urucuzeiro: Agronegócio de corantes naturais. Pessoa J, editor. 2002. 120 p.
 39. Garcia CE, Bolognesi VJ, Dias JF, Miguel OG, Costa CK. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. *Ciência Rural*. 2012;1510–7. Available from:

- http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782012000800029&lang=pt
40. Capella SO, Tillmann MT, Félix AO, Fontoura EG, Fernandes CG, Freitag RA, Santos MA, Félix SR, Nobre MO. Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2016;68(1):104–12. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010209352016000100104&lng=pt&tlng=pt
 41. Oliveira JS. Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L.). 2005. 215p. Available from: [http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:CARACTERIZA??O,+EXTRA??O+E+PURIFICA??O+POR+CROMATOGRAFIA+DE+COMPOSTOS+DE+URUCUM+\(Bixa#0](http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:CARACTERIZA??O,+EXTRA??O+E+PURIFICA??O+POR+CROMATOGRAFIA+DE+COMPOSTOS+DE+URUCUM+(Bixa#0)
 42. Santos LF, Dias VM, Pilla V, Andrade AA, Alves LP, Munin E, Monteiro VS, Zilio SC. Spectroscopic and photothermal characterization of annatto: Applications in functional foods. *Dye Pigment*. 2014;110:72–9.
 43. Constant PB, Stringheta PC, Sandi D. Corantes Alimentícios. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*. 2002;31;20(2). Available from: <http://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/1248>
 44. Madrid RR, Espinosa MA, Conejo YC, Caligaris LG. Carotenoid Derivates in Achiote (*Bixa orellana*) Seeds: Synthesis and Health Promoting Properties. *Frontiers in Plant Science*. 2016;21;7(September):1–7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.01406/abstract>
 45. Lima LR, Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AS, Stringheta PC, Tinoco AL, Silva JF. Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2001;38(4):196–200. Available from: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/issue/view/5890>
 46. Alves R. Extração e Purificação de Corantes de Urucum. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); 2001.192 p.
 47. Kang E, Campbell R, Bastian E, Drake M. Invited review: Annatto usage and bleaching in dairy foods. *Journal of Dairy Science*. 2010;93(9):3891-901.
 48. Giuliano G, Rosati C, Bramley P. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. *Trends Biotechnology*. 2003;21(12):513-6.
 49. Scotter M. The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2009;26(8):1123-45. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030902942873>
 50. Mercadante A, Steck A, Pfander H. Three minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. *Phytochemistry*. 1999; 52(1):135-139.
 51. Campbell RE, Boogers IA, Drake MA. Short communication: Development of a novel

- method for the extraction of norbixin from whey and its subsequent quantification via high performance liquid chromatography. *Journal of dairy science*. 2014;97(3):1313–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030213008758>
52. Souza RM. Corantes Naturais Alimentícios e Seus Benefícios à Saúde. Rio de Janeiro: Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO); 2012. 65p.
 53. Brasil FI. Dossiê Corantes. 2016;24–46.
 54. Alexandre M, Teixeira H. Corantes Artificiais em Alimentos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*. 2009;14:237–50.
 55. Oliveira AP, Jacques GF, Nery VV, Abrantes S. Consumo De Corantes Artificiais Em Balas E Chicletes Por Crianças De Seis a Nove Anos. *Revista Analytica*. 2010;(44):79–85.
 56. Cortada ML, Prado MA. Estudo da estabilidade de corantes alimentícios por espectrofotometria. 2007.
 57. Prado MA, Godoy HT. Teores de corantes artificiais em alimentos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. *Alimentos e Nutrição Araraquara*. 2007;30(2):268–73. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422007000200005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 58. For S, Preparations P. Report on meetings of expert committees and study groups - specifications for pharmaceutical preparations. 2015;(992):1–5.
 59. Valdés AF, Martínez JM, Rodríguez DA, Lizama RS, Gutiérrez Y. Actividad antimalárica de un extracto hidroalcohólico de *Bixa orellana* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2011;63(2):181–5. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602011000200013
 60. Stohs SJ. Safety and Efficacy of *Bixa orellana* (Achiote, Annatto) Leaf Extracts. *Phytotherapy Research*. 2014;28(7):956–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.5088>
 61. Silva JH, Silva EL, Filho JJ, Ribeiro ML, Costa FG. Resíduo da semente de urucum (*Bixa orellana* L.) como corante da gema, pele bico e ovário de poedeiras avaliado por dois métodos analíticos. *Ciência e Agrotecnologia*. 2006;30(5):988–94. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141370542006000500024&lng=pt&tlng=pt
 62. Tupuna DS, Paese K, Guterres SS, Jablonski A, Flôres SH, Rios AO. Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials. *Industrial Crops and Products*. Elsevier; 2018;111:846–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.001>
 63. Alay SC, Tobón JF, Carneiro TF, Meireles MA. Obtaining bixin from semi-defatted

- annatto seeds by a mechanical method and solvent extraction: Process integration and economic evaluation. *Food Research International*. Elsevier; 2017;99:393–402. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.032>
64. Peter K. Handbook of Herbs and Spices. 2nd ed. 2012. 600 p.
 65. Kapoor VP, Katiyar K, Pushpangadan P, Singh N. Development of natural dye based sindoor. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2008;7(1):22–9.
 66. Fletcher A. Food industry “in compliance” with illegal dye regs. Available from: <https://www.foodnavigator.com/Article/2006/12/14/Food-industry-in-compliance-with-illegal-dye-regs>
 67. The safety of annatto extracts (E 160b) as a food additive. *European Food Safety Authority*. 2016;14(8). Available from: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2016.4544>
 68. EU Approved additives and E Numbers. *Food Standards Agency*. Available from: <https://www.food.gov.uk/business-guidance/eu-approved-additives-and-e-numbers>
 69. Nutrition C for FS and A. Color Additive Inventories - Summary of Color Additives for Use in the United States in Foods, Drugs, Cosmetics, and Medical Devices. Center for Food Safety and Applied Nutrition; Available from: <https://www.fda.gov/forindustry/coloradditives/coloradditiveinventories/ucm115641.htm>
 70. Santos BM, Albuquerque CL. Comformidade da rotulagem do colorífico do urucum comercializado no estado da Paraíba. 2003;1721.
 71. Nazário G. Avaliação Toxicológica de Corantes Naturais. Seminário Corantes Naturais para Alimentos (resumos). Instituto de Tecnologia de Alimentos. *Campinas*; 1989. 1-6 p.
 72. Kroes R, Vergen P. Annatto Extracts (Joint Expert on Food Additives 52). 2004 [cited 2018 Aug 20]. Available from: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v52je03.htm>
 73. Paumgartten FJ, Carvalho RR, Araujo IB, Pinto FM, Borges OO, Souza CA, Kuriyama SN. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. *Food and Chemical Toxicology*. 2002;40(11):1595-601.
 74. Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2008 Oct [cited 2018 Aug 17];13(19–20):894–901. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691670>
 75. Mota DR, Flores LJ, Carrari F, Espinoza JA, Sánchez FD, López LL, Hernández GG, Cabrera FR. Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. *Journal of Food Science and Technology*. 2017;16;54(6):1729–41. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-017-2579-7>
 76. Yong YK, Zakaria ZA, Kadir AA, Somchit MN, Lian GC, Ahmad Z. Chemical constituents and antihistamine activity of *Bixa orellana* leaf extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013;14;13(1):32. Available from:

- <http://bmccomplementalrternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-13-32>
77. Islam S, Rather LJ, Mohammad F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications - A review. *Journal of Advanced Research*. Cairo University; 2016;7(3):499–514.
 78. Lima RJ, Moreno AJ, Castro SF, Gonçalves JR, Olivera AB, Sasaki JM, Freire PT. Taninos hidrolisáveis em *Bixa orellana* L. *Química Nova*. 2006;29(3):507–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422006000300019&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 79. Monzote L, García M, Scull R, Cuellar A, Setzer WN. Antileishmanial activity of the essential oil from *Bixa orellana*. *Phytotherapy Research*. 2014;28(5):753–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23983115>
 80. Alves LF, Ming LC. Chemistry and pharmacology of some plants mentioned in the letter of Pero Vaz de Caminha. *Ethnobiology Conservation*. 2015;5;3(February):1–15. Available from: <http://www.ethnobiococonservation.com/index.php/ebc/article/view/57/62>
 81. Braga FG, Bouzada ML, Fabri RL, Matos MO, Moreira FO, Scio E, Coimbra ES. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;111(2):396–402. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874106006374>
 82. García M, Monzote L, Montalvo AM, Scull R. Effect of *Bixa orellana* against *Leishmania amazonensis*. *Forschende Komplementarmedizin*. 2011; 18(6):351–3. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/335280>
 83. Vázquez AA, Mata R, Navarrete A. El reino vegetal, fuente de agentes antiespasmódicos gastrointestinales y antidiarreicos. *Revista Latinoamérica*. 2009;(October 2008):7–44. Available from: <http://www.relaquim.com/archive/2009/p2009371-7.pdf>
 84. Barrio G, Grueiro M, Montero D, Nogal JJ, Escario JA, Muelas S, Fernández C, Vega C, Rolón M, Fernández M, Solís PN, Gupta MP. *In vitro* antiparasitic activity of plant extracts from Panama. *Pharmaceutical Biology*. 2004;29;42(4–5):332–7. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13880200490511945>
 85. Shilpi JA, Taufiq-Ur-Rahman M, Uddin SJ, Alam MS, Sadhu SK, Seidel V. Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;108(2):264–71.
 86. Ramírez BE, Ruíz NN, Arellano JD, Madrigal BR, V, Michel MT, Garzón P. Anticonvulsant effects of *Magnolia grandiflora* L. in the rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998;61(2):143–52. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874198000282>
 87. Gupta M, Mazumder UK, Chakrabarti S. CNS activities of methanolic extract of *Moringa oleifera* root in mice. *Fitoterapia*. 1999;70(3):244–50. Available from:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X99000295>

88. Koster R, Anderson M, Debeer E. Acetic acid analgesic screening. *Federation proceedings*. 1959;18:418–20.
89. Abdullahi AL, Agho MO, Amos S, Gamaniel KS, Wambebe C. Antidiarrhoeal activity of the aqueous extract of *Terminalia avicennoides* roots. *Phytotherapy Research*. 2001;15(5):431–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.860>
90. Zegarra L, Vaisberg A, Loza C, Aguirre RL, Campos M, Fernandez I, Talla O, Villegas L. Double-blind randomized placebo-controlled study of *Bixa orellana* in patients with lower urinary tract symptoms associated to benign prostatic hyperplasia. *International Brazilian Journal of Urology*. 2007; 33(4):493–501. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S167755382007000400006&lng=en&tlng=en
91. Cuspinera GV, Westhoff DC, Rankin SA. Antimicrobial properties of commercial Annatto extracts against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage microorganisms. *Journal of Food Protection*. 2003;66(6):1074–8. Available from: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-66.6.1074>
92. Castello MC, Phatak A, Chandra N, Sharon M. Antimicrobial activity of crude extracts from plant parts and corresponding calli of *Bixa orellana* L. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2002; 40(12):1378-81.
93. Gómez GC, Castillo JC, Pérez JC, Montoya JE. Ethanolic extract from leaves of *Bixa orellana* L.: A potential natural food preservative. *Interciencia*. 2012;37(7):54751.
94. Silva RB, Almeida CR, Chavasco JM, Chavasco JK. Antimycobacterial activity evaluation and MIC determination of liophilized hydroalcoholic extracts of *Bixa orellana* L., Bixaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010;20(2):171–4.
95. Islam UI, Hossain MK, Gomes I, Gomes DJ, Rahman SR, Rahman MS, Rashid MA. Antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic activities of *Bixa orellana* Linn. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2011; 30(6):1126-34.
96. Tamil SA, Dinesh MG, Satyan RS, Chandrasekaran B, Rose C. Leaf and Seed extracts of *Bixa orellana* L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011;1(9):116-20.
97. Martos MV, Gómez GL, Navajas YR, Montoya JE, Sendra E, Álvarez JA, López JF. *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of extracts from Annatto (*Bixa orellana* L.) leaves and seeds. *Journal of Food Safety*. 2012;32(4):399–406. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1745-4565.2012.00393.x>
98. Zuraini A, Somchit M, Abdul Hamid R, Sukardi S, Fazira AJ, Yong Y, Lee HK, Cheng XQ. Inhibitions of acute and chronic inflammations by *Bixa orellana* leaves extract. *Planta Medica*. 2007;73(09). Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2007-986858>
99. Yoke KY, Arifah AK, Sukardi S, Roslida AH, Somchit MN, Zuraini A. *Bixa orellana* leaves

- extract inhibits bradykinin-induced inflammation through suppression of nitric oxide production. *Medical Principles and Practice*. 2011;20(2):142–6. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/319907>
100. Piva RM, Johann AC, Costa CK, Miguel OG, Rosa ER, Azevedo LR, Trevilatto PC, Ignacio SA, Bettega PV, Gregio AM. Bixin action in the healing process of rats mouth wounds. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2013;14(9):785–91. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84893498953&partnerID=40&md5=794aa1a0abe80234e31e3713c9f86a7a>
 101. Conrad OA, Dike IP, Agbara U. *In vivo* antioxidant assessment of two antimalarial plants-*Allamanda cathartica* and *Bixa orellana*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2013;3(5):388–394.
 102. Ahsan R, Islam KM, Musaddik A, Haque E. Hepatoprotective activity of methanol extract of some medicinal plants against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in albino rats. *Global Journal of Pharmacology*. 2009; 3(3):116-122.
 103. Russell KR, Morrison EY, Ragoobirsingh D. The effect of annatto on insulin binding properties in the dog. *Phytotherapy Research*. 2005;19(5):433–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.1650>
 104. Russell KR, Omoruyi FO, Pascoe KO, Morrison EY. The hypoglycaemic activity of *Bixa orellana* extract in the dog. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. 2008;30(4):301. Available from: http://journals.prous.com/journals/servlet/xmlxsl/pk_journals.xml_summary_pr?p_JournalId=6&p_RefId=1186073&p_IsPs=N
 105. Patnaik S, Mishra S, Choudhry G, Panda S, Behera M. Phytochemical investigation and simultaneously study on anticonvulsant, antidiabetic of different leafy extracts of *Bixa orellana* Linn. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. 2011; 2(5):1497-1501.
 106. Ponnusamy S, Ravindran R, Zinjarde S, Bhargava S, Kumar A. Evaluation of traditional Indian antidiabetic medicinal plants for human pancreatic amylase inhibitory effect *in vitro*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011;2011:1–10. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2011/515647/>
 107. Radhika B, Begum N, Srisailam K, Reddy VM. Diuretic activity of *Bixa orellana* Linn. leaf extracts. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2010;1(3):353–5.
 108. Nish WA, Whisman BA, Goetz DW, Ramirez DA. Anaphylaxis to annatto dye: a case report. *Annals of allergy*. 1991;66(2):129-31.
 109. Taylor SL, Hefle SL. Ingredient and labeling issues associated with allergenic foods. *Allergy*. 2001;67:64-9.
 110. Lucas CD, Hallagan JB, Taylor SL. The role of natural color additives in food allergy. In: *Advances in food and nutrition research*. 2001. 195–216 p. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043452601430051>

111. Ebo DG, Ingelbrecht S, Bridts CH, Stevens WJ. Allergy for cheese: evidence for an IgE-mediated reaction from the natural dye annatto. *Allergy*. 2009;64(10):1558–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1398-9995.2009.02102.x>
112. Fernandes AC, Almeida CA, Albano F, Laranja GA, Felzenszwalb I, Lage CL, Sa CC, Moura AS, Kovary K. Norbixin ingestion did not induce any detectable DNA breakage in liver and kidney but caused a considerable impairment in plasma glucose levels of rats and mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002;13(7):411–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286302001778>
113. Morrison EY, Thompson H, Pascoe K, West M, Fletcher C. Extraction of an hyperglycaemic principle from the annatto (*Bixa orellana*), a medicinal plant in the West Indies. *Tropical and geographical medicine*. 1991;43(1-2):184-8.
114. Alves de Lima RO, Azevedo L, Ribeiro LR, Salvadori DM. Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2003; 41(2):189-92.
115. Oliveira AC, Silva IB, Rocha DA, Paumgartten FJ. Induction of liver monooxygenases by annatto and bixin in female rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2003;36(1):113–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100879X2003000100015&lng=en&tlng=en