

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Anissa Algara Beni

**EFEITO DOS CAROTENOIDES DO URUCUM SOBRE A FRAGILIDADE
ERITROCITÁRIA *IN VITRO* E *EX VIVO***

Santa Maria, RS
2019

Anissa Algara Beni

**EFEITO DOS CAROTENOIDES DO URUCUM SOBRE A FRAGILIDADE
ERITROCITÁRIA *IN VITRO* E *EX VIVO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE (A) EM FARMACOLOGIA.**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Emanuelli
Coorientadora: Dr^ª Sabrina Somacal

Santa Maria, RS, Brasil
2019

Beni, Anissa
EFEITO DOS CAROTENOIDES DO URUCUM SOBRE A FRAGILIDADE
ERITROCITÁRIA IN VITRO E EX VIVO / Anissa Beni.- 2019.
74 p.; 30 cm

Orientadora: Tatiana Emanuelli
Coorientadora: Sabrina Somacal
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2019

1. Hemácias. 2. Bixina e Norbixina 3. Potencial anti
hemolítico 4. Ensaio clínico 5. Anemia I. Emanuelli ,
Tatiana II. Somacal, Sabrina III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2019

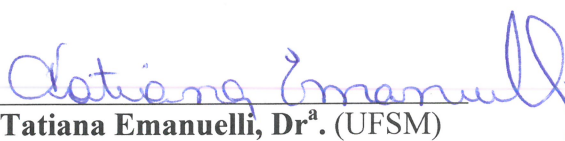
Todos os direitos autorais reservados a Anissa Algara Beni.
A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte. E-mail: anissa.algara@gmail.com

Anissa Algara Beni

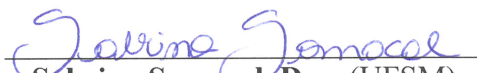
**EFEITO DOS CAROTENOIDES DO URUCUM SOBRE A FRAGILIDADE
ERITROCITÁRIA IN VITRO E EX VIVO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE (A) EM FARMACOLOGIA**.

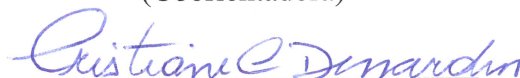
Aprovado em 30 de agosto de 2019:



Tatiana Emanuelli, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Sabrina Somacal, Dra. (UFSM)
(Coorientadora)



Cristiane Casagrande Denardin, Dr^a. (UNIPAMPA)

Maria Rosa Chitolina, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

Dedico este trabalho aos meus avós maternos, a senhora Rosa Mooigimi Bena e o senhor Hendrik Dinsawanie Alfaisie, pois eles reconheceram a importância da educação para seus filhos e as próximas gerações.

RESUMO

EFEITO DOS CAROTENOIDES DO URUCUM SOBRE A FRAGILIDADE ERITROCITÁRIA *IN VITRO* E *EX VIVO*

AUTOR: Anissa Algara Beni
ORIENTADOR: Prof^ª Dr^ª Tatiana Emanuelli
COORIENTADOR: Dr^ª Sabrina Somacal

Os eritrócitos são as células com a principal função de transportar gases respiratórios para os tecidos. Essas células exibem grande suscetibilidade à hemólise em diversas patologias, devido à oxidação de seus componentes celulares. Em situações fisiológicas normais, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é controlada pelo sistema antioxidante endógeno, mantendo continuamente o equilíbrio. No entanto, uma superprodução de ROS resulta em desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, o chamado estresse oxidativo. Os carotenoides bixina (BIX) e norbixina (NBIX) são encontrados principalmente na semente do urucum (*Bixa orellana* L.). Estes compostos possuem excelente capacidade antioxidante e ação anti-inflamatória. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante e a capacidade da BIX e da NBIX em proteger os eritrócitos da hemólise induzida *in vitro* e *ex vivo*. Adultos saudáveis de ambos os sexos participaram do estudo, sendo utilizado para o experimento *in vitro* eritrócitos de 4 voluntários, que foram isolados e co-incubados com diferentes concentrações de BIX ou NBIX e três diferentes indutores de fragilidade celular. No estudo *ex vivo* com delineamento cruzado com retorno, 8 voluntários receberam diariamente uma cápsula contendo BIX ou NBIX (0,05 mg/kg/dia) ou placebo durante sete dias. O ensaio clínico foi randomizado, duplo-cego, controlado por placebo e empregou-se *washout* de 21 dias entre os tratamentos, de modo que todos os voluntários receberam todos os tratamentos em momentos diferentes. Após o último dia de cada tratamento, o sangue foi coletado. Os eritrócitos foram isolados e incubados com três diferentes indutores de dano celular (dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH), glicose e NaNO₂), que atuam por mecanismos distintos. Tanto no estudo *ex vivo* quanto no *in vitro*, após a incubação com os indutores, os eritrócitos foram submetidos aos testes de fragilidade osmótica, onde os eritrócitos foram expostos a diferentes concentrações de NaCl (0,2% a 0,9%), seguido da avaliação do grau de hemólise como indicador da resistência dos eritrócitos. Além disso, no experimento *ex vivo* foi avaliada a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase, bem como os níveis de malondialdeído (MDA), produto da oxidação lipídica. *In vitro*, BIX e NBIX não apenas reduziram a fragilidade da membrana eritrocitária induzida por AAPH, glicose ou NaNO₂, mas também melhoraram a resistência osmótica basal em concentrações micromolares. A suplementação com BIX ou NBIX aumentou significativamente a resistência da membrana eritrocitária, e a suplementação com BIX foi a mais efetiva. Além disso, BIX e NBIX protegeram os eritrócitos da peroxidação lipídica e melhoraram o ambiente redox celular. Nosso estudo demonstra o potencial anti-hemolítico dos carotenoides do urucum, ao impedir e/ou reduzir a fragilidade da membrana de eritrócitos humanos. Adicionalmente, contribui para ampliar o entendimento acerca das propriedades benéficas do consumo humano de carotenoides, especialmente a BIX e a NBIX.

Palavras-chave: Potencial anti-hemolítico. Bixina. Norbixina. Ensaio clínico. Anemia. Hemácias.

ABSTRACT

EFFECT OF URUCUM CAROTENOIDS ON ERITROCYTE FRAGILITY IN *VITRO* AND *EX VIVO*

AUTHOR: Anissa Algara Beni
ADVISOR: Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Emanuelli
CO-ADVISOR: Dr^ª. Sabrina Somacal

Erythrocytes are the cells with the main function of transporting respiratory gases to tissues. These cells exhibit high susceptibility to hemolysis in various pathologies due to oxidation of their cellular components. Under physiological conditions, the production of reactive oxygen species (ROS) is controlled by the endogenous antioxidant system, continuously maintaining balance. However, an overproduction of ROS results in an imbalance between the pro and antioxidant system, called oxidative stress. The carotenoids bixin (BIX) and norbixin (NBIX) are mainly found in annatto seeds (*Bixa orellana* L.). These compounds have excellent antioxidant capacity and anti-inflammatory action. The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity and the ability of BIX and NBIX to protect erythrocytes from *in vitro* and *ex vivo* induced hemolysis. Healthy adults of both sexes participated in the study. Erythrocytes from 4 volunteers were isolated for the *in vitro* experiment and co-incubated with different concentrations of bixin or norbixin and three different inducers of cell fragility. In the *ex vivo* study, 8 volunteers received a daily capsule containing BIX or NBIX (0.5 mg/kg/day) or placebo for 7 days, in a crossover design. The randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial was performed using a 21-day washout period between treatments, so that all volunteers received all treatments at different times. After the last day of each treatment, blood was collected. Erythrocytes were isolated and incubated with three different cell damage inducers (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), glucose and NaNO₂), which act by different mechanisms. In both the *ex vivo* and *in vitro* studies, after incubation with the inducers, the erythrocytes were submitted to osmotic fragility tests, where the erythrocytes were exposed to different NaCl concentrations (0.2 to 0.9%), with erythrocyte resistance being evaluated later. Moreover, in the *ex vivo* experiment, the activity of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase, as well as the levels of lipid oxidation malondialdehyde (MDA) were evaluated. *In vitro*, BIX and NBIX not only reduced AAPH, glucose or NaNO₂-induced erythrocyte membrane fragility, but also improved basal osmotic resistance in the micromolar range. BIX and NBIX supplementation significantly increased erythrocyte membrane resistance, and BIX supplementation was the most effective. In addition, BIX and NBIX protected erythrocytes from lipid peroxidation and improved the cellular redox environment. Our study demonstrates the antihemolytic potential of annatto carotenoids by preventing and/or reducing membrane fragility of human erythrocytes. Additionally, it contributes to broaden understanding of the beneficial properties of human consumption of carotenoids, especially BIX and NBIX.

Keywords: Antihemolytic potential. Bixin. Norbixin. Clinical trial. Anemia. Red blood cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

| | |
|--|----|
| Figura 1: Eritrócitos e estrutura da hemoglobina. | 14 |
| Figura 2: Diagnóstico para anemia. | 15 |
| Figura 3: Estrutura da bixina e da norbixina. | 18 |
| Figura 4: A- Planta, B- Folhas e flores, e C-sementes e corantes da <i>Bixa Orellana</i> | 18 |
| Figura 5: Representação esquemática dos experimentos <i>in vitro</i> | 24 |
| Figura 6: Esquema do protocolo de suplementação de voluntários saudáveis com BIX, NBIX ou placebo durante 7 dias. | 26 |

MANUSCRITO

| | |
|---|----|
| Figure 1 – Chemical structure of bixin and norbixin and representative scheme of in vitro design. | 50 |
| Figure 2 – Representative figure of treatment scheme followed by volunteers. | 50 |
| Figure 3 - In vitro effect of bixin (A-C) and norbixin (D-F) on erythrocyte osmotic fragility after AAPH, glucose or NaNO ₂ exposure. | 51 |
| Figure 4 - Effect of carotenoid supplementation on erythrocyte osmotic fragility after AAPH (A), glucose (B) or NaNO ₂ (C) ex vivo exposure. | 52 |
| Figure 5 - Effect of carotenoid supplementation on MDA (A-C) and GSH (D-F) levels in red blood cells after AAPH, glucose or NaNO ₂ ex vivo exposure. | 53 |
| Figure 6 - Effect of bixin and norbixin supplementation on superoxide dismutase (A-C), catalase (D-E), and glutathione peroxidase (G-I) activities in erythrocytes after AAPH, glucose or NaNO ₂ ex vivo exposure. | 54 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Condições utilizadas para determinação espectrofotométrica de bixina e norbixina nas formulações estudadas..... | 22 |
| Tabela 2: Composição centesimal dos extratos contendo bixina e norbixina..... | 23 |
| Tabela 3: Características basais dos voluntários selecionados..... | 25 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| AAPH | Dicloridrato de AAPH-2,2'-Azobis (2-amidinopropano) |
| BIX | Bixina |
| IMC | Índice de Massa Corporal |
| Cat | Catalase |
| DM | Diabetes Mellitus |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| GPX | Glutationa peroxidase |
| GSH | Glutationa reduzida |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta performance |
| JEFCA | Comitê Conjunto de Especialistas FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| MDA | Malondialdeído |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NaNO ₂ | Nitrito de sódio |
| NBIX | Norbixina |
| Nrf2 | Fator nuclear relacionado ao eritróide 2 |
| PDA | Detector de arranjo de fotodiodos |
| PUFAs | Ácidos graxos poli-insaturados |
| RCF | Campo centrífugo relativo |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| SOD | Superóxido dismutase |
| EROs | Espécies reativas do oxigênio |
| CT-H | Células tronco hematopoiéticas multipotente |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 1.1 Referencial teórico..... | 13 |
| 1.1.1 Eritrócitos..... | 13 |
| 1.1.2. Anemia..... | 15 |
| 1.1.3. Estresse oxidativo..... | 17 |
| 1.1.4. Carotenoides..... | 18 |
| 1.1.5 Carotenoides do urucum..... | 18 |
| 1.2 Objetivos..... | 20 |
| 1.2.1 Objetivo geral..... | 20 |
| 1.2.2 Objetivos específicos..... | 20 |
| 1.3 Material e métodos..... | 21 |
| 1.3.1 Considerações éticas..... | 21 |
| 1.3.2 Critérios de inclusão e exclusão..... | 21 |
| 1.3.3 Obtenção e composição dos extratos contendo bixina e norbixina..... | 22 |
| 1.3.3.1 Obtenção de BIX e NBIX..... | 22 |
| 1.3.3.2 Identificação e quantificação de bixina e norbixina..... | 22 |
| 1.3.3.3 Composição centesimal das formulações contendo BIX e NBIX..... | 23 |
| 1.3.4 Ensaio <i>in vitro</i> | 24 |
| 1.3.5 Ensaio <i>ex vivo</i> | 26 |
| 1.3.5.1 Considerações e protocolo de suplementação..... | 26 |
| 1.3.5.2 Análises..... | 28 |
| 1.3.5.2.1 Parâmetros antropométricos..... | 28 |
| 1.3.5.2.2 Marcadores bioquímicos..... | 29 |
| 1.3.5.2.3 Indução da fragilidade osmótica..... | 29 |
| 1.3.5.2.4 Avaliação do estresse oxidativo em eritrócitos..... | 29 |
| 1.3.5.2.5 Atividade das enzimas antioxidantes em eritrócitos..... | 30 |
| 1.3.6 Análise estatística..... | 31 |
| 2. DESENVOLVIMENTO..... | 32 |
| 2.1 Manuscrito..... | 32 |
| 3. CONCLUSÃO..... | 56 |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 57 |
| 5. ANEXOS..... | 61 |
| ANEXO 1..... | 61 |
| ANEXO 2..... | 66 |
| ANEXO 3..... | 68 |

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está apresentada no formato de manuscritos científicos integrados, seguindo as normas do Manual de Dissertações e Teses da UFSM (MDT), versão 2015.

O trabalho está organizado da seguinte forma: primeiramente é apresentada a INTRODUÇÃO, contendo o Referencial teórico, os Objetivos e Material e métodos utilizados para a execução dessa dissertação. A seguir é apresentado o DESENVOLVIMENTO, que traz os resultados que fazem parte deste documento e que serão apresentados sob a forma de um manuscrito. As seções Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representam na íntegra este estudo.

O item CONCLUSÃO, está disposto após o item DESENVOLVIMENTO e contém o resumo dos principais resultados dessa dissertação. A seção REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS apresenta a bibliografia citada na seção INTRODUÇÃO desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

Os eritrócitos ou hemácias ou, ainda, células vermelhas são as células mais abundantes presentes na corrente sanguínea, e têm como principal função o transporte eficiente de gases respiratórios entre o pulmão e os tecidos corporais (RIAZ et al., 2016). Estas células apresentam forma circular e bicôncava e são dotadas de grande flexibilidade, que é uma característica importante por permitir que os eritrócitos atinjam pontos estreitos da microcirculação (KUHN et al., 2017). A membrana eritrocitária possui considerável quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), o que torna essa estrutura celular, e conseqüentemente os eritrócitos, suscetível à peroxidação lipídica por espécies reativas de oxigênio (EROs) (ÇIMEN, 2008). A peroxidação lipídica reduz a flexibilidade e a resistência osmótica da membrana eritrocitária, aumenta a permeabilidade da membrana, o que resulta em estresse osmótico, seguido de destruição eritrocitária por hemólise (PARAISO et al., 2017). Quando a destruição dos eritrócitos é mais rápida que a síntese, instala-se um quadro de anemia, condição na qual o número de hemácias (e conseqüentemente sua capacidade de transporte de oxigênio) é reduzida e/ou insuficiente para atender às necessidades fisiológicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Além disso, a anemia pode ser uma condição secundária em algumas doenças crônicas, como na artrite reumatoide (ÇIMEN et al., 2000) e no diabetes mellitus (DM) (ÇIMEN, 2008).

Diversos estudos têm avaliado compostos naturais que possuem ação benéfica na saúde humana e que estão sendo denominados como nutracêuticos (KALRA, 2003). Esses compostos que estão naturalmente presentes nos alimentos, e que também podem ser obtidos purificados a partir de fontes alimentares, demonstram atividade antioxidante e anti-inflamatória, e podem ser úteis no tratamento e prevenção de diversas doenças, sobretudo as crônicas (PACKER, 2001). Dentre esses compostos, destacam-se os carotenoides, que são pigmentos com coloração amarelo-avermelhada. Os carotenoides são compostos tetraterpênicos, formados por uma cadeia de polienos conjugados, que representam o cromóforo responsável pela cor (KAULMANN; BOHN, 2014). A cadeia poliênica também é a principal responsável pela reatividade química dos carotenoides em relação a agentes oxidantes e EROs e, portanto, ao seu papel antioxidante (CHISTÉ et al., 2014).

A bixina (BIX) e a norbixina (NBIX) são carotenoides encontrados nas sementes de urucum (*Bixa orellana L.*) (STRINGHETA et al., 2018). A BIX é um apocarotenoide lipossolúvel, responsável por mais de 80% do conteúdo total dos compostos encontrados nas

sementes de urucum (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001). A NBIX, o análogo hidrossolúvel da BIX, é encontrada em baixa concentração nas sementes de urucum, porém pode ser obtida por hidrólise da BIX (RODRIGUES et al., 2007). Tanto a BIX quanto a NBIX são amplamente utilizadas como corantes na indústria de alimentos e em outras indústrias, como a de cosméticos. Em 2015 o Brasil era o principal produtor mundial de urucum (SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA, 2015).

Estudos *in vitro* e *in vivo* revelam que os carotenoides do urucum possuem baixa toxicidade (BAUTISTA et al., 2004), com propriedades antioxidante (OBOH et al., 2011) e anti-inflamatória (SOMACAL et al., 2015), além de modular o metabolismo de carboidratos e lipídios (ROEHRS et al., 2014). Recentemente, nosso grupo de pesquisa investigou os efeitos protetores da BIX e NBIX em modelos experimentais de aterosclerose e diabetes (SOMACAL, 2016; ROEHRS et al., 2017). Os resultados indicam que os efeitos antiaterogênicos da BIX estão relacionados a prevenção da oxidação da LDL, melhora do perfil de lipoproteínas plasmáticas e do equilíbrio redox celular, além de ação anti-inflamatória e redução da formação das células espumosas e das lesões ateroscleróticas (SOMACAL, 2016). Esses dados sugerem um novo papel para o carotenoide BIX como potencial agente antiaterogênico. Já no estudo com modelo animal de diabetes, a BIX teve ação anti-hiperglicêmica semelhante à da metformina além de melhorar o perfil lipídico (ROEHRS et al., 2014). Além disso, a BIX protegeu contra a nefropatia em modelo de diabetes em ratos, indicado pela redução da glicose e proteína urinárias, além da redução de danos histológicos (ROEHRS et al., 2014). A NBIX foi ineficaz na proteção contra a hiperglicemia e dislipidemia e apenas provocou uma redução parcial dos níveis de glicose urinária (ROEHRS et al., 2014). Em trabalho adicional de nosso grupo, verificamos em indivíduos saudáveis que após o consumo de uma refeição hipercalórica, a NBIX reduziu a lipoperoxidação e os níveis pós-prandiais de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) (ROEHRS et al., 2017).

Os estudos realizados até o momento demonstram que a BIX e a NBIX apresentam ação benéfica, sobretudo em condições nas quais o estresse oxidativo é um evento chave (SOMACAL et al., 2015; ROEHRS et al., 2017; CONTE et al., 2019). Por isso, a importância da continuação dos estudos com esses compostos bioativos em outras condições e patologias. Assim, este trabalho visa demonstrar a ação da BIX e NBIX na proteção frente a hemólise de eritrócitos através da redução da fragilidade eritrocitária. Este efeito é relevante, considerando o aumento da fragilidade eritrocitária associado a diversas condições patológicas, como o DM, a artrite reumatoide e a insuficiência renal crônica, que podem resultar em anemia, como uma

condição secundária. Com este trabalho também esperamos elucidar os mecanismos pelos quais os carotenoides conseguem proteger a membrana eritrocitária. Com a conclusão deste estudo avançaremos no conhecimento acerca dos benefícios dos carotenoides do urucum, que além de atuar em doenças crônicas que são consideradas problemas de saúde pública, também poderiam atenuar potenciais consequências destas patologias, como a anemia. Os resultados também poderão impactar positivamente no desenvolvimento da indústria nacional de corantes naturais, visto que o Brasil é atualmente o primeiro produtor e exportador mundial de urucum.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1. Eritrócitos

Os eritrócitos são as células mais abundantes encontradas na corrente sanguínea, têm como principal função o transporte de gases respiratórios e têm uma vida média de 100-120 dias (RIAZ et al., 2016). Os eritrócitos dos mamíferos são todos anucleados e formam-se em um processo conhecido como eritropoiese, cujos mecanismos moleculares ainda não são bem compreendidos (LIANG et al., 2015). A eritropoiese humana é um processo complexo e de várias etapas, que inicia com a diferenciação de células tronco hematopoiéticas multipotente (CT-H) da medula óssea em megacariócitos e progenitores eritrocitários, que darão origem a eritroblastos e posteriormente a eritrócitos maduros na corrente sanguínea (ORKIN, 2000).

O primeiro passo da diferenciação eritrocitária envolve uma fase na qual os CT-Hs se diferenciam em progenitores eritrocitários (ZIVOT et al., 2018). A segunda fase envolve a diferenciação dos precursores nucleados de pró-eritroblastos para eritroblastos basofílicos, policromatofílicos e ortocromáticos. Essa fase é caracterizada pelo acúmulo gradual de hemoglobina, diminuição progressiva do tamanho das células e condensação nuclear. Durante a diferenciação eritrocitária terminal, as células descartam todas as suas organelas, incluindo as mitocôndrias, os lisossomos, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, ribossomos e RNA (KENT et al., 1966; HEYNEN et al., 1985; SANDOVAL et al., 2008). A fase final do desenvolvimento dos eritrócitos envolve a liberação dos reticulócitos na corrente circulatória e sua maturação em eritrócitos. É nesta fase que o eritrócito adquire a sua forma bicôncava através de extensa remodelação da membrana (ZIVOT et al., 2018).

Durante a maturação eritrocitária, os reticulócitos liberam pequenas vesículas contendo proteínas celulares. Esses veículos são exossomos envolvidos na depuração de proteínas da superfície celular, como acetilcolinesterase, receptor de transferrina CD71 e integrina $\alpha_4\beta_1$ (HONG et al., 1976; ESHGHI et al., 2007). Os eritrócitos requerem energia para manter uma série de funções celulares vitais. Estas incluem (1) manutenção da glicólise; (2) manutenção do gradiente eletrolítico entre o citoplasma plasmático e eritrocitário através da atividade de bombas de membrana acionadas por adenosina trifosfato (ATP); (3) síntese de glutatona e outros metabólitos; (4) metabolismo de purinas e pirimidinas; (5) manutenção do ferro da hemoglobina em seu estado ferroso funcional, reduzido; (6) proteção de enzimas metabólicas, hemoglobina e proteínas da membrana da desnaturação oxidativa; e (7) preservação da

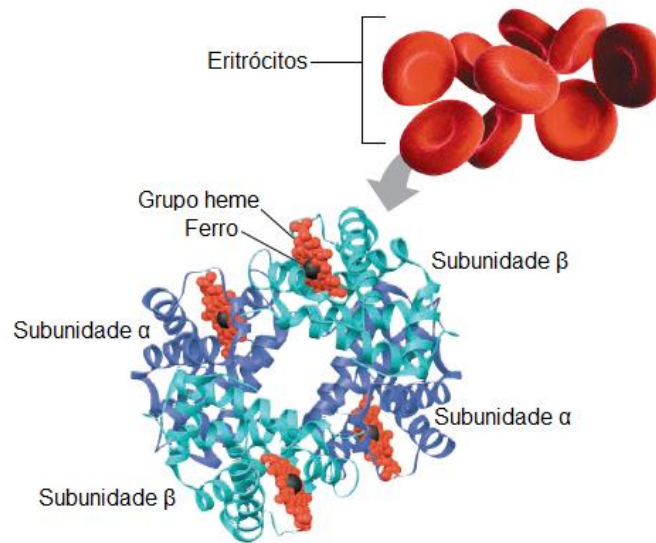
assimetria fosfolipídica da membrana. Devido à falta de núcleo e mitocôndrias, os eritrócitos maduros são incapazes de gerar energia através do ciclo (oxidativo) de Krebs. Em vez disso, os eritrócitos dependem da conversão anaeróbica de glicose pela via de Embden-Meyerhof para a geração e armazenamento de fosfatos de alta energia (SURGENOR, 1974).

Os eritrócitos humanos maduros têm um diâmetro de 6 a 8 μm . Essas células anucleadas apresentam uma forma circular e bicôncava sendo dotadas de grande flexibilidade devido ao arranjo das membranas. As membranas são compostas por 52% de proteínas, 40% de lipídeos e 8% de carboidratos (RIAZ et al., 2016). A membrana eritrocitária compreende 3 camadas: uma camada externa rica em carboidratos (o glicocálix), uma bicamada lipídica contendo numerosas proteínas transmembrana e, no lado citoplasmático da bicamada lipídica, uma rede interna de proteínas que forma o esqueleto da membrana. As proteínas do esqueleto da membrana proporcionam a durabilidade, flexibilidade e deformabilidade do eritrócito, permitindo que ele passe através de capilares (3 μm) com menos da metade do diâmetro do eritrócito e depois recupere a forma discoide original (YAZDANBAKHSI et al., 2000). A resistência mecânica e a deformabilidade da hemácia são derivadas principalmente da estrutura única da espectrina, o principal componente do esqueleto da membrana (YAZDANBAKHSI et al., 2000).

Entre as proteínas presentes nos eritrócitos está a hemoglobina, uma proteína globular que tem a propriedade de ligar e transportar o oxigênio (RIAZ et al., 2016). A hemoglobina tem uma estrutura quaternária que consiste em quatro subunidades polipeptídicas, duas do tipo α e duas do tipo β . Ambas as subunidades consistem principalmente de estrutura secundária em α -hélice. Cada subunidade tem um componente não polipeptídico, chamado heme, com um átomo de ferro que se liga ao oxigênio (Fig. 1) (URRY et al., 2017).

Os eritrócitos permanecem na circulação por aproximadamente 120 dias, e após este período, as células danificadas são removidas por macrófagos localizados na medula óssea, fígado e baço.

Figura 1: Eritrócitos e estrutura da hemoglobina



Fonte: adaptação de URRY et al., 2017.

1.1.2. Anemia

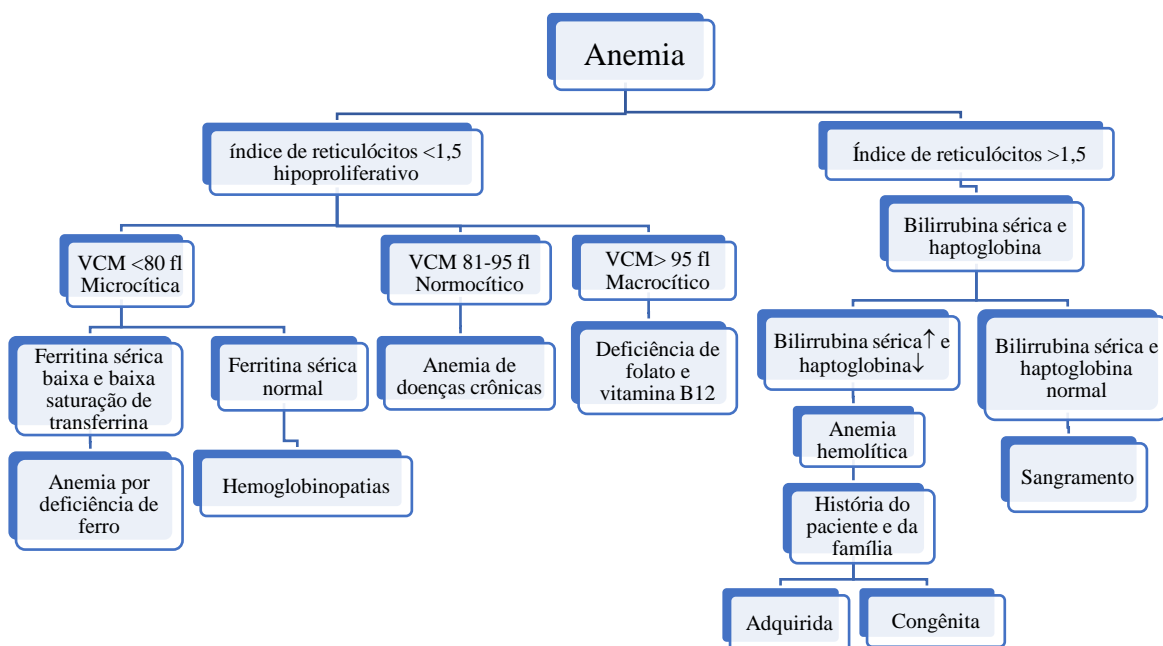
A anemia é uma condição na qual o número de hemácias ou sua capacidade de transporte de oxigênio é insuficiente ou inadequada para atender às necessidades fisiológicas do corpo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Segundo dados da OMS, a anemia afeta 1,62 bilhão de pessoas, o que corresponde a 24,8% da população mundial. No entanto, os dados globais não podem descrever a situação real do problema, porque a anemia é multifatorial. A maior prevalência da anemia é registrada em crianças menores de 4 anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Para ter uma indicação de distúrbios sanguíneos, pode ser calculado o hematócrito, que corresponde ao volume do sangue ocupado pelos eritrócitos. Os valores normais de hematócrito podem variar de acordo com o sexo e idade, sendo para homens entre 42-52% e para mulheres 36-48% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Valores de hematócrito muito altos ou muito baixos indicam distúrbios sanguíneos, como por exemplo a anemia, que é uma condição na qual o número de hemácias (e conseqüentemente sua capacidade de transporte de oxigênio) é insuficiente para atender às necessidades fisiológicas do corpo. Para fins práticos, a anemia pode ser classificada com base no volume celular médio (VCM) ou no mecanismo patológico

subjacente (anormalidades hipoproliferativas/de maturação/aumento da destruição dos eritrócitos).

As anemias são muito diversas de natureza como representado na figura 2 (DOMENICA CAPPELLINI; MOTTA, 2015). Na maioria das anemias, a patogênese envolve várias etapas na produção ou destruição dos eritrócitos, desde deficiências proteicas durante a eritropoiese até influências mecânicas que levam à hemólise, onde os eritrócitos frequentemente sofrem estresse oxidativo.

Figura 2: Diagnóstico para anemia. VCM: volume celular médio.



Fonte: Adaptado de DOMENICA CAPPELLINI; MOTTA, 2015.

Nas anemias hemolíticas (causadas por patógenos, uso de medicamentos, ou consequência de uma doença crônica) os tecidos sofrem estresse oxidativo e os EROs atacam várias organelas; assim há destruição dos eritrócitos de forma mais acelerada que a síntese de novas células, levando a valores de hematócrito reduzidos. Os fatores que diminuem a resistência osmótica e causam anemia hemolítica incluem a infecção por certos parasitas e micro-organismos (infecções por *Plasmodium*, *Babesia* e *Clostridium*), bem como o uso de alguns fármacos como cefotetan, ceftriaxona e piperacilina (GARRATTY; PETZ, 1975; DHALIWAL et al., 2004).

Além disso, a anemia pode ser secundária a algumas doenças crônicas, como artrite reumatoide (ÇIMEN et al., 2000), diabetes mellitus (BAYNES, 1991; ÇIMEN, 2008) e insuficiência renal crônica (MEHDI; TOTO, 2009).

O teste de fragilidade osmótica (OFT) é usado para medir a resistência eritrocitária à hemólise, e consiste na exposição dos eritrócitos a níveis variados de diluição de uma solução salina. A base para esta medida tem sido o fato de que a membrana eritrocitária tem uma resistência contra a pressão intracelular. Quando submetidas a concentrações hipotônicas, a água do meio se movimenta para dentro da célula pela osmose. Assim, tem mais pressão sobre a membrana eritrocitária. Geralmente, quando em soluções de 0,2% de salina, ou perto desse valor, os eritrócitos sofrem hemólise. Quando em 0,7% de salina, os eritrócitos ficam intactos, já que o valor osmótico interno das células e a solução são iguais (PARPART et al., 1947).

1.1.3. Estresse oxidativo

Devido ao fato das membranas dos eritrócitos serem constituídas de quantidades consideráveis de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), essas estruturas são altamente suscetíveis a eventos oxidativos, mais especificamente a peroxidação lipídica, por espécies reativas (ÇIMEN, 2008). A peroxidação lipídica reduz a flexibilidade e a resistência osmótica da membrana eritrocitária e aumenta a permeabilidade da membrana, resultando em estresse osmótico, seguido de destruição de eritrócitos por hemólise (PARAISO et al., 2017)

Espécies reativas é um termo coletivo utilizado para designar espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). São espécies químicas altamente reativas, geralmente com propriedades oxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Em condições fisiológicas normais ERO/ERN são produzidas em níveis baixos e são necessárias para a manutenção de funções celulares como a produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). As ERO/ERN mais relevantes originadas nos sistemas biológicos incluem: o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxil ($\bullet OH$), óxido nítrico ($\bullet NO$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$) e o ácido hipocloroso ($HOCl$) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

1.1.4. Carotenoides

Os carotenoides são compostos tetraterpenoides que apresentam atividade antioxidante e anti-inflamatória e podem ser úteis no tratamento e prevenção de doenças crônicas (KAULMANN; BOHN, 2014). Os carotenoides são pigmentos naturais com colorações que variam do amarelo ao vermelho e que estão amplamente distribuídos nas plantas (KAULMANN; BOHN, 2014). Sua estrutura molecular se caracteriza por uma longa cadeia poliênica, que é a principal responsável pela reatividade química contra agentes oxidantes e radicais livres (WANG et al., 1997), sequestrando o oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio (PÉREZ; BINDERS, 2003), resultando na atividade antioxidante. A função biológica mais descrita para os carotenoides é o seu papel como precursores da vitamina A (TANUMIHARDJO S., 2013).

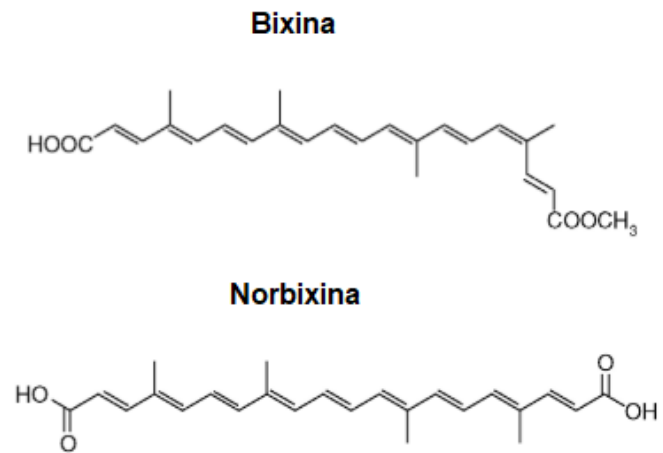
Vários estudos demonstraram que diferentes compostos naturais pertencentes ao grupo dos terpenos têm efeito antioxidante. Acredita-se que sua capacidade antioxidante esteja envolvida nos efeitos nutracêuticos das frutas e legumes (GRABMANN, 2005; KAULMANN; BOHN, 2014; STRINGHETA et al., 2018).

1.1.5 Carotenoides do urucum

A BIX e a NBIX (estruturas das moléculas na figura 3) são carotenoides, encontrados majoritariamente na superfície das sementes do urucum (*Bixa orellana*) (Figura 4) (RODRIGUES et al., 2007). A BIX é um apo carotenoide lipossolúvel, responsável por mais de 80% do conteúdo total dos compostos presentes nas sementes de urucum (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001). A NBIX, um análogo hidrossolúvel da BIX, é encontrada em baixa concentração nas sementes de urucum, mas pode ser obtida por hidrólise da BIX (RODRIGUES et al., 2007). Tanto a BIX quanto NBIX são amplamente utilizadas como corantes na indústria de alimentos e em outras indústrias (STRINGHETA et al., 2018).

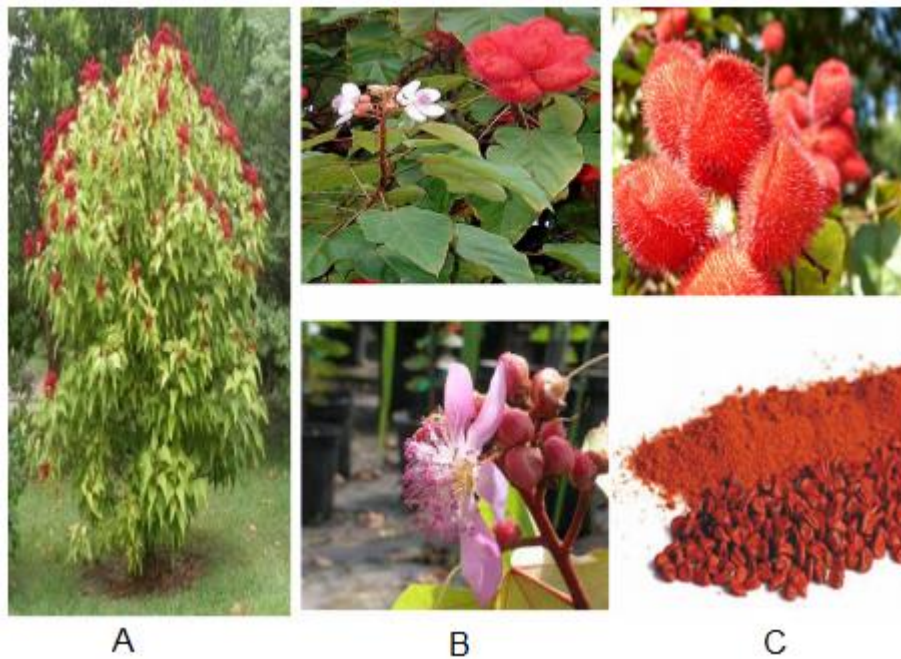
Estudos *in vitro* e em modelos animais mostram que estes compostos têm baixa toxicidade (BAUTISTA et al., 2004), com propriedades antioxidantes (OBOH et al., 2011) e anti-inflamatórias (SOMACAL et al., 2015), além de modular o metabolismo de carboidratos e lipídios (ROEHRS et al., 2014).

Figura 3: Estrutura da bixina e da norbixina



Fonte: (EMANUELLI et al., 2017).

Figura 4: A- Planta, B- Folhas e flores, e C- sementes e corantes da Bixa Orellana



Fonte: SHAHID-UL-ISLAM et al., 2016.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 **Objetivo geral**

Avaliar *in vitro* e *ex vivo* o potencial benéfico dos carotenoides do urucum BIX e NBIX frente a modelo de lise eritrocitária em sangue humano.

1.2.2 **Objetivos específicos**

- Verificar *in vitro* os efeitos da BIX e NBIX na resistência eritrocitária contra a hemólise induzida por diferentes agentes químicos;
- Avaliar se a suplementação por via oral com BIX ou NBIX durante 7 dias melhora a resistência eritrocitária contra hemólise induzida *ex vivo* por diferentes agentes químicos;
- Avaliar se a suplementação por via oral com BIX ou NBIX durante 7 dias modifica e/ou previne as alterações no status redox celular após incubação *ex vivo* com diferentes indutores de dano celular.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido nas dependências do Núcleo Integrado de Análises Laboratoriais (NIDAL). O recrutamento dos voluntários tanto da parte *in vitro* (4 voluntários) quanto a *ex vivo* (16 voluntários) foi feito em diferentes departamentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) entre estudantes e servidores da UFSM.

1.3.1 Considerações éticas

O protocolo de estudo foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e aprovado sob o número CAAE 68801917.0.0000.5346. Este estudo está de acordo com as normas da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas envolvendo seres humanos, e possui registro no endereço eletrônico: ClinicalTrials.gov 68801917.0.0000.5346.

No primeiro encontro, os possíveis participantes da pesquisa receberam informações sobre os objetivos do estudo e os riscos da participação na presente pesquisa, tendo liberdade de optar ou não em participar do estudo e/ou abandonar o estudo a qualquer momento, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 1).

1.3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Os indivíduos selecionados como participantes da pesquisa deveriam ter idade entre 18 e 35 anos (adultos jovens), índice de massa corporal (IMC) entre 18,5 – 24,9 kg/m² e valores normais para glicemia, perfil lipídico e marcadores das funções hepática e renal. Foram excluídos do estudo indivíduos que faziam uso de medicamentos alopáticos, fitoterápicos ou suplementos (minerais, vitamínicos, etc.); bem como tabagistas e portadores de câncer, doenças crônicas (diabetes, hipertensão), doenças auto imunes (lúpus, artrite, entre outras), inflamatórias (asma) ou infecciosas (virais, bacterianas ou fúngicas) no último mês.

1.3.3 Obtenção e composição dos extratos contendo bixina e norbixina

1.3.3.1 Obtenção de BIX e NBIX

Os carotenoides BIX e NBIX foram fornecidos pela empresa Christian Hansen do Brasil, indústria de corantes do ramo alimentício. A BIX foi fornecida pela empresa na forma de pó e utilizada desta forma no estudo. Já o corante NBIX, por estar na forma líquida, primeiramente optou-se por tratar conforme descrito por (CONTE et al., 2019), através da adição de HCl 5% para reduzir o pH para valores entre 2 e 4 e promover a precipitação do sal de norbixato. A suspensão foi lavada com água deionizada e liofilizada para obtenção do pó que foi utilizado no estudo.

1.3.3.2 Identificação e quantificação de bixina e norbixina

O teor de cada carotenoide foi avaliado nas formulações através de análises espectrofotométricas e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*).

A determinação do teor de BIX e NBIX por espectrofotometria foi realizado conforme Tochini & Mercadante (2001), conforme a tabela 1.

Tabela 1: Condições utilizadas para determinação espectrofotométrica de bixina e norbixina nas formulações estudadas.

| Carotenoide | Solvente | ϵ | λ (nm) |
|--------------------|----------------------------|------------|----------------|
| Bixina | Clorofórmio | 2826 | 470 |
| Norbixina | Solução aquosa de KOH 0,5% | 3473 | 453 |

Legenda: ϵ = coeficiente de extinção molar, λ = comprimento de onda.

As formulações contendo os carotenoides do urucum foram analisados por HPLC acoplado à detector de arranjo de diodos (DAD, do inglês *diodo array detector*) (CBM-20A Prominence, Shimadzu LC), utilizando uma coluna Synergi 4 µm Hydro RP 80A (250 × 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, USA). Acetonitrila:ácido fórmico 2% (fase móvel A) e água ultrapura (Milli-Q Gradient System, Millipore Corporation, Massachusetts, EUA):ácido fórmico 2% (fase móvel B) foram utilizadas como fase móvel.

Para uma melhor separação e resolução dos picos, foi escolhida a eluição por gradiente: 30% de B e 70% de A por 10 min, 5% de B e 95% de A por 10 min, retornando para 30% de B e 70% de A por 10 min; totalizando 30 min de corrida. O fluxo utilizado foi de 0,9 mL/min, volume de injeção de 20 µL e temperatura de 38°C. As amostras de BIX e NBIX foram diluídas em clorofórmio e metanol, respectivamente, para a confecção de soluções-mãe, que foram diluídas na fase móvel inicial (70% de A e 30% de B) e filtradas (filtros 0,22 µm PTFE hidrofílico) para injeção no equipamento. Os compostos foram identificados pela comparação de seus espectros de absorção e tempos de retenção com os respectivos padrões e dados da literatura. Os padrões de BIX e NBIX foram produzidos em laboratório (RIOS; MERCADANTE, 2004; TOCCHNI, L; MERCADANTE, 2001) e utilizados na confecção da curva de calibração e dos limites de detecção e quantificação (LoD e LoQ, respectivamente), bem como nos testes de recuperação. A quantificação dos compostos foi realizada em 460 nm.

1.3.3.3 Composição centesimal das formulações contendo BIX e NBIX

Umidade, cinzas, proteína bruta, fibra alimentar foram determinados conforme AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2007). Os lipídios totais foram extraídos usando clorofórmio e metanol e quantificados por gravimetria (BLIGH; DYER, 1959). Os carboidratos não fibrosos foram determinados por diferença matemática. A composição centesimal e o teor de BIX e NBIX estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Composição centesimal dos extratos contendo bixina e norbixina

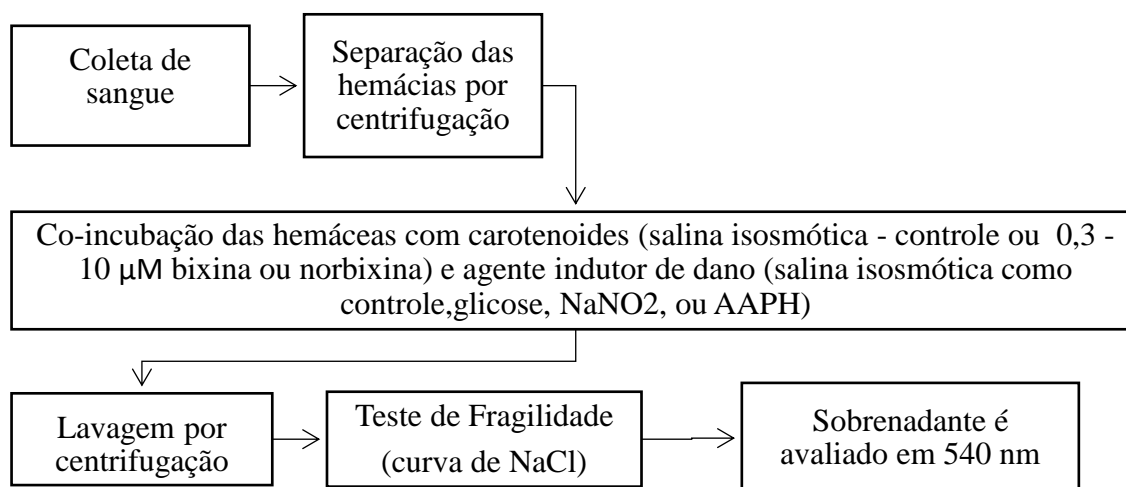
| Parâmetro | Bixina | Norbixina |
|-------------------------------|---------------|------------------|
| Umidade (%) | 34,0 ± 0,3 | 3,16 ± 0,2 |
| Cinzas (%) | 2,0 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 |
| Gorduras (%) | 17,9 ± 1,7 | Nd |
| Proteínas (%) | 0,2 ± 0,01 | 0,2 ± 0,01 |
| Carboidratos não fibrosos (%) | 10,1 ± 0,1 | 70,3 ± 0,1 |
| Fibra dietética total (%) | 35,9 ± 2,0 | 25,9 ± 1,5 |
| Bixina (%) | 30,4 ± 0,1 | - |
| Norbixina (%) | - | 42,0 ± 0,1 |

Os valores são expressos em média ± DP. Nd: não detectado.

1.3.4 Ensaio *in vitro*

Para os testes *in vitro* foram coletadas amostras de sangue de 4 voluntários (sem jejum) em tubos contendo EDTA como anticoagulante. Cada voluntário doou 20 mL de sangue (4 tubos de 5 mL), que foi coletado por flebotomia do membro superior. Após a coleta, o sangue foi centrifugado para a separação da papa de hemácias que foi utilizada para avaliação da fragilidade osmótica eritrocitária após incubação com os carotenoides BIX ou NBIX em 4 modelos diferentes de indução de fragilidade eritrocitária: basal (com NaCl 0,9%) ou induzida por nitrito de sódio, 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (AAPH) ou glicose (Figura 5). Esses modelos foram escolhidos porque aumentam a fragilidade osmótica através da indução de estresse oxidativo por diferentes mecanismos. O AAPH gera radicais peróxil, que promovem peroxidação lipídica causando lesão nas membranas das hemácias (CHISTÉ et al., 2014). A glicose em concentrações elevadas induz a produção de radicais superóxido via auto-oxidação e ativação da NADPH oxidase (REIS et al., 2008). Os íons nitrito interagem com a oxihemoglobina para formar metemoglobina e H₂O₂, através de uma reação que é caracterizada por um período de latência seguido de uma fase auto catalítica rápida (ZAVODNIK et al., 1999; JOHNSON et al., 2005).

Figura 5: Representação esquemática dos experimentos *in vitro*



Fonte: autoria pessoal.

Para indução da fragilidade osmótica, a suspensão de hemácias em salina 0,9% (hematócrito ajustado para 10%) foi exposta, a 37°C, a uma das seguintes condições: NaNO₂ (1 mM, 60 min), glicose (180 mM, 180 min), AAPH (20 mM, 180 min), ou tampão (salina 0,9%, condição basal, por 180 min). As hemácias foram co-incubadas simultaneamente com os agentes indutores de dano e com os carotenoides (salina 0,9%, condição basal ou bixina ou norbixina em concentrações de 0,03 a 10 µM). As concentrações dos carotenoides utilizadas no trabalho *in vitro* foram escolhidas a partir de um ensaio piloto e dissolvidas apenas no momento da incubação com DMSO em salina 0,9% (concentração final de DMSO 0,05%).

Após a incubação, as células foram imediatamente lavadas com NaCl 0,9% e submetidas ao teste de fragilidade osmótica, realizado de acordo com o método descrito por Dacie & Lewis (1975), onde os eritrócitos foram submetidos a uma curva com concentrações decrescentes de NaCl (0,9% a 0,2%). A fragilidade eritrocitária foi avaliada por espectrofotometria através da liberação de hemoglobina a 540 nm. As etapas do experimento *in vitro* estão representadas na figura 5.

A porcentagem de hemólise dos eritrócitos em cada concentração salina tamponada com fosfato correspondente (0,9-0,2 g / 100 ml) foi calculada como a porcentagem de absorvância em relação à absorvância dos eritrócitos incubados com água destilada (hemólise a 100%). A concentração correspondente de solução salina tamponada com fosfato que causou 50% de hemólise de eritrócitos foi definida como o índice de fragilidade corpuscular média (MCF)(PARPART et al., 1947; CHIKEZIE et al., 2010; SOUZA et al., 2016). Os valores de

MCF foram obtidos por análise de regressão não linear da curva de fragilidade osmótica eritrocitária cumulativa, isto é, o gráfico da percentagem de hemólise de eritrócitos versus concentrações de solução salina tamponada com fosfato. A capacidade relativa de BIX ou NBIX (condição de teste) para estabilizar ou desestabilizar a membrana dos eritrócitos foi avaliada como a estabilidade relativa (%) = $(MCF_{control} - MCF_{test} / MCF_{control}) \times (100/1)$ (CHIKEZIE et al., 2010). Condições que desestabilizam a membrana celular (concentrações salinas tamponadas com fosfato mais altas) causarão hemólise, resultando em valores maiores de MCF e valores menores de estabilidade relativa.

1.3.5 Ensaio *ex vivo*

1.3.5.1 Considerações e protocolo de suplementação

Os indivíduos selecionados foram orientados a permanecer em jejum por 8 horas e comparecer no Laboratório Núcleo Integrado de Análises Laboratoriais (NIDAL- prédio 46) para coleta de sangue (10 mL), por flebotomia do membro superior, para a realização de exames laboratoriais (basal), aferição da pressão sanguínea e medidas antropométricas. Os participantes que apresentaram níveis normais desses marcadores foram convidados a continuar na pesquisa.

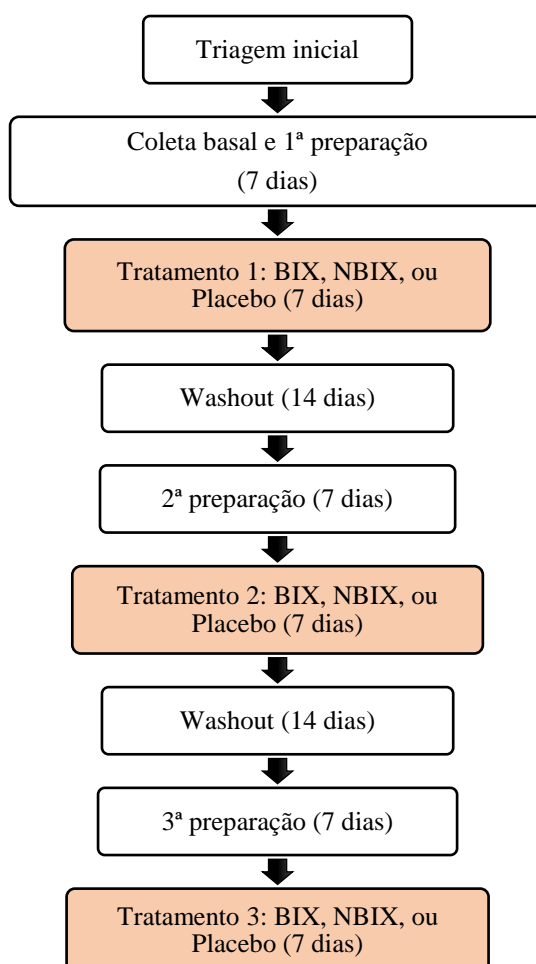
Tabela 3: Características basais dos voluntários selecionados

| Parâmetros | População |
|-------------------------------|-------------|
| Idade (anos) | 25,4 ± 0,9 |
| Peso (kg) | 66,0 ± 3,0 |
| Altura (m) | 1,8 ± 0,03 |
| Circunferência abdominal (cm) | 80,6 ± 2,2 |
| Pressão arterial (mmHg) | 11,6 ± 0,5 |
| IMC (kg/cm ²) | 22,9 ± 0,6 |
| Glicose (mg/dL) | 90,4 ± 2,3 |
| Colesterol total (mg/dL) | 177,7 ± 7,5 |
| HDL (mg/dL) | 53,4 ± 3,8 |
| LDL (mg/dL) | 107,0 ± 4,2 |
| Triglicerídeos (mg/dL) | 86,7 ± 12,2 |
| VLDL | 16,2 ± 9,0 |
| ALT (U/L) | 19,4 ± 2,1 |
| AST (U/L) | 19,0 ± 1,7 |
| Creatinina (mg/dL) | 1,1 ± 0,1 |
| Ureia (mg/dL) | 27,1 ± 1,4 |

Valores estão expressos como média \pm SEM (n=13). HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase.

Nos encontros seguintes, realizados no NIDAL, cada voluntário recebeu um dos 3 tratamentos propostos (BIX ou NBIX ou placebo, figura 6) em 3 momentos distintos com *washout* de pelo menos 14 dias entre os tratamentos, para eliminar qualquer influência do tratamento anterior. Cada período de tratamento (1 semana) foi precedido de uma semana de preparo, compreendendo assim 2 semanas de intervenção. Dessa forma, cada indivíduo recebeu um tratamento diferente a cada mês.

Figura 6: Esquema do protocolo de suplementação de voluntários saudáveis com BIX, NBIX ou placebo durante 7 dias.



Fonte: autoria pessoal.

A sequência dos tratamentos foi escolhida por sorteio, sem repetição das sequências possíveis. No primeiro dia de cada tratamento, os participantes se apresentaram no NIDAL e receberam 7 cápsulas contendo um dos três tratamentos [BIX 0,05 mg/kg p.c., NBIX 0,05 mg/kg p.c. ou placebo (amido de milho)], que foram encapsulados manualmente usando uma balança analítica e tamanho 1 de cápsulas, com o conteúdo das cápsulas variando de acordo com o peso individual de cada voluntário. As cápsulas foram consumidas em 7 dias consecutivos (1 cápsula/dia), sendo que a primeira dose foi consumida no NIDAL juntamente com o café da manhã. As doses de carotenoides escolhidas para este estudo foram baseadas nas recomendações da FAO/OMS para ingestão diária aceitável da NBIX (0,6 mg/kg p.c.), escolhendo-se um valor inferior para que não houvesse nenhum comprometimento da saúde dos participantes. Apesar disso, os voluntários foram instruídos a relatar qualquer reação diferente que aparecesse em decorrência da suplementação com os carotenoides, como intolerâncias, desconforto gastrointestinal (náuseas, vômito, diarreia), dores de qualquer natureza, dentre outras.

Durante o período de intervenção (semana de preparação e do tratamento) os sujeitos foram orientados a evitar o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, alimentos gordurosos ou que possuam urucum ou outros carotenoides (tomate, cenoura, molhos, embutidos, salgadinhos, biscoitos, condimentos etc.). Além disso, nestas semanas, os voluntários confeccionaram um diário alimentar (ANEXO 3), onde indicaram qual e quantitativamente os alimentos ingeridos.

No dia seguinte ao consumo da última cápsula (8º dia), os voluntários retornaram ao NIDAL em jejum de 8 horas para coleta final de sangue (20 mL). As coletas de sangue foram feitas por punção da veia basílica ou veia mediana cubital com sistema à vácuo em tubos com EDTA para obtenção das hemácias após centrifugação.

1.3.5.2 Análises

1.3.5.2.1 Parâmetros antropométricos

Para avaliar globalmente o estado de saúde dos voluntários, parâmetros antropométricos como peso corporal, altura e circunferência da cintura (CC) foram avaliados durante o processo de triagem. O peso corporal foi avaliado através de balança portátil digital, com o indivíduo descalço, em posição ereta e indicado em quilograma (kg). A altura (metros) foi aferida no indivíduo ereto, com os calcanhares unidos e com a cabeça e glúteos em contato com um

estadiômetro portátil. A circunferência abdominal foi determinada manualmente conforme a Anthropometric Standardization Reference, logo abaixo da última costela (LOHMAN, ROCHE, MARTORELL, 1988).

1.3.5.2.2 Marcadores bioquímicos

Os níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, HDL, glicose, ureia, creatinina, AST e ALT foram dosados por kits colorimétricos (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) no analisador semiautomático Labmax 100 (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). A LDL foi calculada usando a equação de Friedewald e a VLDL foi estimada pela fórmula: $VLDL = CT - TG/5$. Já a hemoglobina foi determinada na papa de hemácias no mesmo dia da coleta utilizando kit colorimétrico (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

1.3.5.2.3 Indução da fragilidade osmótica

Após centrifugação, as hemácias dos voluntários que consumiram BIX, NBIX ou placebo por 7 dias foram incubadas com indutores de dano celular para indução da fragilidade osmótica. A suspensão de hemácias em salina 0,9% (hematócrito ajustado para 10%) foi exposta, a 37°C, a uma das seguintes condições: NaNO₂ (1 mM, 60 min), glicose (180 mM, 180 min), AAPH (20 mM, 180 min), ou tampão (salina 0,9%, condição basal, por 180 min).

Após a incubação, as células foram imediatamente lavadas com NaCl 0,9% e submetidas ao teste de fragilidade osmótica, realizado de acordo com o método descrito por Dacie & Lewis (1975), onde os eritrócitos foram submetidos a uma curva com concentrações decrescentes de NaCl (0,9% a 0,2%). A fragilidade eritrocitária foi avaliada por espectrofotometria através da liberação de hemoglobina a 540 nm.

1.3.5.2.4 Avaliação do estresse oxidativo em eritrócitos

A peroxidação lipídica foi avaliada por HPLC/UV-vis a partir da determinação dos níveis de MDA nas hemácias que foram previamente incubadas com indutores de dano celular. Após a incubação, as hemácias submetidas à hidrólise alcalina com hidróxido de sódio 3 N e incubadas à 60°C por 30 min. Em seguida, o meio de reação foi acidificado com ácido fosfórico

6% e as amostras foram derivatizadas com TBA 0,8%, em banho-maria à 90°C por 45 min. As amostras foram resfriadas e congeladas à - 20 °C até a análise cromatográfica. A extração do MDA das amostras foi feita minutos antes da injeção no cromatógrafo, pela adição de 50 µL de SDS 10% e de 300 µL de n-butanol, seguida de agitação (1 min) e de uma etapa de centrifugação à 3000 *x g* por 10 min. A fase butanólica, contendo o MDA, foi aspirada e filtrada em membrana PTFE 0,22 µm e injetada manualmente no equipamento (GROTTO et al., 2007).

A análise cromatográfica foi conduzida em cromatógrafo líquido Shimadzu acoplado à detector UV/visível (SPD-20AV), utilizando uma coluna C-18 Zorbax 5 µm, 250 x 4,6mm, (Agilent). Foi utilizada uma eluição isocrática com as fases móveis metanol e água ultrapura (Milli-Q Gradient System, Millipore Corporation, Massachusetts, EUA), na proporção 50:50. O volume de injeção utilizado foi de 20 µL e o tempo de corrida foi de 10 min. A quantificação foi realizada em 540 nm, utilizando uma curva de calibração de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). Os níveis de MDA foram corrigidos pelo teor de hemoglobina e expressos em nmol/mg de Hb.

Os níveis de GSH foram determinados nas hemácias através da reação com o orto-ftalaldeído (OPT), gerando um produto fluorescente, analisado utilizando 350 nm para excitação e 420 nm para emissão (HISSIN; HILF, 1976). A quantificação dos níveis de glutathiona nas hemácias foi feita a partir de curvas de padrão de GSH e expressa em µg/g de hemoglobina.

1.3.5.2.5 Atividade das enzimas antioxidantes em eritrócitos

A atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx foram avaliadas no papa de hemácias obtida após a incubação com os indutores de dano celular. A atividade da SOD foi avaliada através da inibição da auto-oxidação da epinefrina, determinada em 480 nm (MISRA; FRIDOVICH, 1972). A CAT teve sua atividade avaliada após a adição de peróxido de hidrogênio ao meio, pela queda da absorbância em 240 nm (AEBI, 1984). A oxidação do NADPH na presença de peróxido de hidrogênio e GSH, verificada através da queda da absorbância em 340 nm, foi utilizada na determinação da atividade da GPx (PAGLIA; VALENTINE, 1967). A atividade das enzimas antioxidantes foi corrigida pela quantidade de hemoglobina das amostras.

1.3.6 Análise estatística

Os dados de fragilidade osmótica dos eritrócitos foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) no estudo *ex vivo* ou ANOVA de duas vias (concentração de carotenóides x indutor) no ensaio *in vitro*. Os dados sobre o status oxidante/antioxidante do estudo *ex vivo* foram analisados por ANOVA de duas vias (tratamento carotenoide x indutor). O teste de Duncan foi usado para comparações post-hoc. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Toda a análise estatística foi conduzida usando o sistema de software Statistica® versão 9.0 (StatSoft, Inc., 2004). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M.).

O número de participantes necessários para este estudo foi calculado por meio de uma análise de poder estatístico para detectar 25% de diferença entre médias, considerando um desvio padrão de 20%, erro alfa de 0,05 e poder de prova de 0,8 (80%) como descrito por Conte et. al. (CONTE et al., 2019).

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 MANUSCRITO

DIETARY SUPPLEMENTATION WITH ANNATTO FOOD COLORING EXTRACTS
PROTECT ERYTHROCYTE MEMBRANES FROM OXIDATIVE STRESS IN HEALTHY
SUBJECTS

Anissa Algara Beni, Renata Fritzsche Rodrigues, Lisiane Conte, Isabella Ferreira Costa, Érika
Aparecida Delalibera, miguel roehrs, Cristine Rampelotto, Tatiana Emanuelli, Sabrina
Somacal

Manuscrito submetido ao periódico:

Nutrition Research

1 **Dietary supplementation with annatto food coloring extracts protects erythrocyte**
2 **membranes from oxidative stress in healthy subjects**

3
4 Anissa Algara Beni^{1,2,*}, Renata Fritzsche Rodrigues^{2,*}, Lisiane Conte^{1,2}, Isabella Ferreira
5 Costa², Érika Aparecida Delalibera², Miguel Roehrs², Cristine Rampelotto³, Tatiana
6 Emanuelli^{2,**}, Sabrina Somacal^{2,3,**}

7
8 ¹Graduate Program on Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa
9 Maria, 97105-9003, Santa Maria, RS, Brazil;

10 ²Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of Food
11 Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-
12 900, Santa Maria, RS, Brazil;

13 ³Graduate Program on Food Science and Technology, Center of Rural Sciences, Federal
14 University of Santa Maria, 97105-9003, Santa Maria, RS, Brazil;

15

16 *These authors contributed equally to the study.

17 **Corresponding authors. Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL),
18 Department of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of
19 Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil; Tel.: +55 55 3220 8547; fax: +55 55 3220
20 8353.

21 E-mail address: s_somacal@hotmail.com (Sabrina Somacal); tatiana.emanuelli@ufsm.br
22 (Tatiana Emanuelli);

23

24

25 **List of abbreviations:**

- 26 AAPH- 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
27 BIX- Bixin
28 BMI- Body mass index
29 CAT- Catalase
30 DMSO- Dimethyl sulfoxide
31 EDTA- Ethylenediaminetetraacetic acid
32 GPX- Glutathione peroxidase
33 GSH- Glutathione reduced
34 HPLC- High-performance liquid chromatography
35 JEFCA- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
36 LDL- low-density lipoprotein
37 MDA- Malondialdehyde
38 NaCl- Sodium chloride
39 NaNO₂- Sodium nitrite
40 NBIX- Norbixin
41 Nrf2- Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
42 PDA- Photodiode array detector
43 PUFAs- Polyunsaturated fatty acids
44 RCF- Relative centrifugal field
45 ROS- Reactive oxygen species
46 SOD- Superoxide dismutase

47

48

49

50 **Abstract**

51 Erythrocytes exhibit high susceptibility to hemolysis in several pathologies due to oxidation
52 of cellular components. The objective of this study was to evaluate whether food grade
53 annatto carotenoids can increase human erythrocyte resistance to hemolysis *in vitro* and *ex*
54 *vivo*. For the *in vitro* experiment, erythrocytes from healthy volunteers were isolated and co-
55 incubated with BIX or NBIX and either AAPH, glucose or NaNO₂ as hemolysis inducers. In
56 the *ex vivo* study, healthy volunteers consumed a capsule containing BIX or NBIX (0.05
57 mg/kg b.w./day) or placebo during 7 days before blood sample collection. Their erythrocytes

58 were isolated and incubated with either AAPH, glucose or NaNO₂. Both in the *ex vivo* and *in*
59 *vitro* study, erythrocytes were subjected to osmotic fragility tests. The activity of antioxidant
60 enzymes and GSH and lipid peroxidation levels was also evaluated *ex vivo*. *In vitro* BIX and
61 NBIX not only reduced erythrocyte membrane fragility induced by AAPH, glucose, or
62 NaNO₂ but also improved basal osmotic resistance in the micromolar range. BIX and NBIX
63 supplementation increased the erythrocyte membrane resistance significantly, with BIX being
64 more effective. Also, BIX and NBIX protected the erythrocytes from lipid peroxidation and
65 improved the cellular redox environment. Our study contributes to important insights that
66 annatto carotenoids may exert antihemolytic potential by preventing membrane fragility in
67 human erythrocytes.

68

69 **Keywords:** Antihemolytic potential; Bixin; Norbixin; Clinical trial; Anemia; Erythrocyte
70 fragility.

71

72 **1. Introduction**

73 Erythrocytes, the most abundant cells found in the bloodstream, have the main function of
74 efficient transportation of respiratory gases to tissues [1]. These cells have a circular and
75 biconcave shape and are endowed with great flexibility, which is a key feature for
76 erythrocytes to reach some tight spots in microcirculation [2]. The erythrocyte membrane
77 consists of high amounts of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which makes the cell
78 susceptible to lipid peroxidation by reactive oxygen species (ROS) [3]. Lipid peroxidation
79 reduces the flexibility and osmotic resistance of erythrocyte membrane and increases
80 membrane permeability resulting in osmotic stress followed by erythrocyte destruction due to
81 hemolysis [4]. When erythrocyte destruction is faster than synthesis, hematocrit values
82 decrease and cause anemia, a condition in which the number of red blood cells (and
83 consequently their oxygen-carrying capacity) is insufficient to meet the body's physiologic
84 needs [5].

85 Anemias are very diverse in nature; in most anemias the pathogenesis involves several steps
86 in the production or destruction of erythrocytes ranging from protein deficiencies during
87 erythropoiesis to mechanical influences which lead to hemolysis, where erythrocytes often
88 undergo oxidative stress. Physiological influences causing hemolytic anemia include infection
89 by certain parasites and microorganisms (*Plasmodium*, *Babesia* and *Clostridium* infections),
90 as well as certain drugs [6]. In addition, anemia can be secondary to chronic diseases such as
91 rheumatoid arthritis [7], and diabetes mellitus [3], due to an increased free radical production
92 possibly due to hyperglycemia.

93 Carotenoids are tetraterpenoids compounds that present antioxidant and anti-inflammatory
94 activity and may be useful in the treatment and prevention of chronic diseases [8]. Despite the
95 presence of endogenous antioxidants in erythrocytes, these cells are highly susceptible to
96 oxidative damage and some carotenoids, such as β -carotene, zeaxanthin, lutein, β -
97 cryptoxanthin and lycopene, are able to inhibit the pro-oxidant effect provided by ROS [9]
98 Bixin (BIX) and norbixin (NBIX) are natural carotenoids obtained from annatto seeds (*Bixa*
99 *orellana*) [10] and are consumed worldwide as natural food coloring additives in the food
100 industry (annatto, E160b) and as a dye in other industries [10]. BIX is a liposoluble
101 apocarotenoid, responsible for more than 80% of the total carotenoid content of annatto seeds
102 [11]. NBIX, a water-soluble analogue of BIX, is found at low concentrations in annatto seeds,
103 but can be obtained by the hydrolysis of BIX [10].

104 Different *in vitro* and *in vivo* studies show that BIX and NBIX have low toxicity [12],
105 antioxidant properties [13] and anti-inflammatory properties in hypercholesterolemia rabbit
106 models [14], rat diabetes models [15] and in other chronic diseases related to oxidative and
107 inflammatory damage [8]. In addition to this evidence of nutraceutical effects in animal
108 models, a clinical study has demonstrated that a single dose of NBIX attenuates the
109 inflammatory response and oxidative stress triggered by the intake of a hypercaloric meal
110 [16], also a 1-week supplementation with BIX reduced the susceptibility of LDL-cholesterol
111 to Cu²⁺-induced oxidation *ex vivo* [17]. Based on the information above and considering that
112 there is no scientific basis in the literature on the antihemolytic properties of annatto
113 carotenoids, the present study was designed to investigate for the first time: (i) the *in vitro*
114 effect of BIX and NBIX on erythrocyte membrane resistance to hemolysis; (ii) the *ex vivo*
115 osmotic fragility of human erythrocytes after a 7-day BIX and NBIX dietary supplementation.
116

117 **2. Materials and Methods**

118 **2.1 BIX and NBIX extracts**

119 Food coloring annatto were provided by Christian Hansen Co. Ltd. (Valinhos, SP, Brazil).
120 The BIX-enriched annatto powder (30.4% bixin) was used for the BIX treatment, whereas the
121 annatto alkaline extract was precipitated with acid and lyophilized to obtain a NBIX-enriched
122 powder (42.0%) that was used for the NBIX treatment. The content of annatto carotenoids in
123 the extracts was preliminary assessed by spectrophotometric analysis at 470 nm. Thereafter,
124 the concentrations of BIX and NBIX were assessed by high performance liquid
125 chromatography (HPLC) coupled to a photodiode arrangement (PDA) detector [17].
126

127 **2.2 Study subjects**

128 Healthy volunteers aged between 18 and 32 years, with a BMI between 18.5-24.9 kg/m² and
129 normal values for hematocrit, glycemia, lipid profile of hepatic and renal function markers
130 (data not shown) were selected for the *in vitro* and *ex vivo* studies [18]. Exclusion criteria
131 were the recent ongoing use of medications, herbal medicines or dietary supplements
132 (minerals and vitamins) use, smoking, chronic diseases (diabetes, hypertension, lupus,
133 arthritis, asthma, etc.), cancer, or infectious diseases (viral, bacterial or fungal).
134 Subjects were fully informed of the experimental protocol as well as the possible risks and
135 discomforts of the investigation before giving their written informed consent. The study was
136 conducted according to the Declaration of Helsinki, and the study protocol was approved by
137 the local ethics committee (CAAE number: 68801917.0.0000.5346).
138

139 **2.3 *In vitro* study**

140 The blood of 4 volunteers was collected in EDTA-containing tubes and freshly erythrocyte
141 samples were isolated by centrifugation (1500 RCF for 10 min) and used for the hemolysis
142 assays. Erythrocytes (hematocrit adjusted to 10%) were incubated 37 ° C with the carotenoids
143 BIX (0.3 µM -10 µM) or NBIX (0.03 µM -10 µM) or vehicle (control) in the absence (basal,
144 NaCl 0.9%) or in the presence of an inducer of hemolysis (1 mM NaNO₂ or 20 mM AAPH
145 during 60 min, or 180 mM glucose during 180 min) (Figure 1). Carotenoid concentrations for
146 this *in vitro* assay were chosen from a pilot study and dissolved in vehicle (DMSO with saline
147 0.9%).
148

149 Insert Figure 1 here:

150

151 2.3.1 Assessment of erythrocyte osmotic fragility

152 Osmotic fragility of erythrocytes was determined by assessing hemoglobin release when cells
153 are placed in an environment containing serial dilutions of phosphate buffered saline solution
154 as described by Parpart et al. [18]. After incubation with carotenoids and/or inducers, cells
155 were immediately washed 2 times with 0.9% NaCl at 1500 RCF for 10 minutes and subjected
156 to the osmotic fragility test, which was performed according to Dacie and Lewis' method
157 [19]. Parallel samples of erythrocytes (10 μ L) were subjected to decreasing concentrations of
158 phosphate buffered saline, pH 7.4 (0.9, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3 and 0.2 g/100 mL) and distilled
159 water during 10 minutes at 37°C. Subsequently, tubes were centrifuged at 900 RCF for 10
160 min. The supernatant was removed and had its absorbance assessed at 540 nm to evaluate the
161 hemoglobin released due to hemolysis [18,19].

162

163 2.3.2 Index of erythrocyte hemolysis and stability

164 The percentage of erythrocyte lysis at each corresponding phosphate buffered saline
165 concentration (0.9 - 0.2 g/100 mL) was calculated as the percentage of absorbance relative to
166 the absorbance of erythrocytes incubated with distilled water (100% hemolysis). The
167 corresponding concentration of phosphate buffered saline solution that caused 50% lysis of
168 erythrocytes was defined as the mean corpuscular fragility (MCF) index [18,20]. MCF values
169 were obtained by nonlinear regression analysis of the cumulative erythrocyte osmotic fragility
170 curve, i.e. the plot of percentage of erythrocyte lysis versus concentrations of phosphate
171 buffered saline solution. The relative capacity of BIX or NBIX (test condition) to stabilize or
172 destabilize erythrocyte membrane was evaluated as the relative stability (%) = $(MCF_{\text{control}} -$
173 $MCF_{\text{test}}/MCF_{\text{control}}) \times (100/1)$ [18,20]. Conditions that destabilize the cell membrane (higher
174 phosphate buffered saline concentrations) will cause hemolysis, consequently resulting in
175 higher MCF values and lower relative stability values.

176

177 **2.4 Ex vivo study**

178 2.4.1 Human supplementation with annatto carotenoids

179 Among the 21 volunteers that met our inclusion criteria, 3 were excluded due to health
180 problems or other reasons. Eighteen participants went through the initial screening phase,
181 while 2 participants abandoned the study due to an infectious disease or other reasons.
182 Erythrocyte samples from 3 selected donors could not be analyzed right after blood collection

183 and were consequently not included in this study to avoid discrepant results. Serum glucose
184 levels, lipid profile, markers of renal and hepatic function, anthropometric measurements,
185 blood pressure was within normal values and data has been published in another study which
186 was performed using the same blood samples with its focus on the susceptibility of LDL
187 oxidation and dietary intervention [17].

188 Ultimately, blood samples from 13 volunteers that had received dietary supplementation with
189 placebo, BIX or NBIX were used for this *ex vivo* assessment of the effect of annatto
190 carotenoids on erythrocyte fragility. Each treatment consisted of a daily capsule of placebo
191 (corn starch) or 0.05 mg/kg of body weight (b.w.) of BIX or NBIX that was taken preferably
192 at breakfast, for 7 days. A Latin Square crossover design was used; all subjects received the
193 three treatments during the study in different periods, with a washout period that ranged from
194 1 to 3 weeks. During the intervention period (weeks of preparation and treatment) the subjects
195 were instructed to avoid excessive consumption of alcoholic beverages, fatty foods or that
196 have annatto or other carotenoids (tomato, carrot, sauces, sausages, Snacks, biscuits,
197 condiments, etc.). Treatments were coded (A, B, and C), and sequences were randomly
198 distributed among volunteers with a balanced design for the treatment sequence. The dose of
199 carotenoids chosen for this clinical trial (0.05 mg/kg b.w.) is lower than the acceptable daily
200 intake (ADI) for BIX (12 mg/kg b.w.) and NBIX (0.6 mg/kg b.w.) [21]. One day after the
201 consumption of the last capsule, blood (10 mL, EDTA vacuum tubes) was collected from the
202 basilic vein or cubital median vein of fasting subjects (12 hours fasting) (Figure 2: *ex vivo*
203 treatment scheme).

204

205 Insert Figure 2 here

206

207

208 2.4.2 Erythrocyte fragility induction

209 Fresh blood samples collected from volunteers (section 2.4.1) were centrifuged at 1500 RCF
210 for 10 minutes. Erythrocytes were collected, the hematocrit was adjusted to 10% and samples
211 (10 μ L) were incubated with 0.9% NaCl (control, 180 min) or cell damage inducers (1 mM
212 NaNO₂ for 60 minutes, 180 mM glucose or 20 mM AAPH for 180 minutes). After incubation,
213 samples were withdrawn for determining erythrocyte osmotic fragility and for
214 antioxidant/oxidant status.

215

216 2.4.3 Assessment of erythrocyte osmotic fragility and relative stability

217 After incubation (section 2.4.2), cells were immediately washed 2 times with 0.9% NaCl at
218 1500 RCF for 10 min and subjected to the osmotic fragility test as described in section 2.3.1.
219 The relative capacity of BIX or NBIX (test condition) to stabilize or destabilize erythrocyte
220 membrane was evaluated as the relative stability (%) = $(MCF_{\text{control}} - MCF_{\text{test}}/MCF_{\text{control}}) \times$
221 $(100/1)$ [18,20] according to section 2.3.2.

222

223 2.4.4 Evaluation of oxidative status

224 Lipid peroxidation product, MDA, was evaluated in erythrocytes samples that were
225 derivatized with thiobarbituric acid and then analyzed by HPLC-UV/Vis, using a Zorbax
226 ODS C18 5 μm column (250 \times 4.6 mm, Agilent, Santa Clara, USA) [22].

227 Reduced (GSH) glutathione content in erythrocytes was quantified by fluorimetry according
228 to Hissin & Hilf [23], using O-phthaldialdehyde. Briefly, samples were deproteinized with 0.6
229 M perchloric acid, centrifuged and the supernatant solution obtained was used for the assay.
230 Reduced glutathione standard curve was used to quantify the erythrocyte levels of GSH, and
231 values were normalized for hemoglobin content.

232

233 2.4.5 Antioxidant enzymes activities in erythrocytes

234 Intracellular superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx)
235 activities were measured through spectrophotometric methods according to Fridovich [24],
236 Aebi [25] and Paglia & Valentini [26], respectively, and values were normalized for the
237 hemoglobin content.

238

239 **2.6 Statistical analysis**

240 Erythrocyte osmotic fragility data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA)
241 in the *ex vivo* study or two-way ANOVA (carotenoid concentration \times inducer) in the *in vitro*
242 assay. Data on the oxidant/antioxidant status of the *ex vivo* study were analyzed by two-way
243 ANOVA (carotenoid treatment \times inducer). Duncan's test was used for post-hoc comparisons.
244 Differences were considered significant when $p < 0.05$. All statistical analysis was completed
245 using Statistica® version 9.0 software system (StatSoft, Inc., 2004). The data were expressed
246 as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.).

247 The number of participants required for this study was calculated using a power analysis to
248 detect 25% difference among means, considering a standard deviation of 20%, alpha error of
249 0.05, and power of 0.8 (80%) as described by Conte et. al. [17].

250 **3. Results**

251

252 3.1 *In vitro* effect of BIX and NBIX on erythrocyte membrane resistance

253 To assess whether BIX and NBIX carotenoids could modify the erythrocyte membrane
254 resistance, cells were incubated with carotenoids in the absence (basal) or presence of a
255 membrane damage inducer (Fig. 3). Incubation with BIX or NBIX in the absence of
256 membrane damage inducers significantly increased erythrocyte membrane resistance to
257 osmotic stress ($P < 0.05$; Fig 3A-F). This effect had bell-shaped behavior being evident at
258 intermediate concentrations (up to 3.0 μM carotenoid at most conditions).

259 All membrane damage inducers investigated increased erythrocyte osmotic fragility. In this
260 study, NaNO_2 (Fig. 3C, 3F) and AAPH (Fig. 3A, 3D) reduced by ~4 and 5% erythrocyte
261 stability to osmotic lysis, whereas glucose reduced erythrocyte stability by ~16% (Fig. 3B,
262 3E). Co-incubation with 0.3, 1.0 and 10 μM BIX (Fig. 3A) and all NBIX concentration (Fig.
263 3D) protected cells against fragility induced by AAPH. Erythrocytes incubated with BIX (0.3,
264 1.0 and 10 μM) and $\text{NBIX} \leq 3 \mu\text{M}$ protected cells from glucose-induced fragility (Fig. 3B and
265 E, respectively). All BIX concentrations and 0.1 and 0.3 μM NBIX protected the erythrocytes
266 from increased membrane fragility induced by NaNO_2 (Fig. 3C and F, respectively).

267

268 3.2 *Ex vivo* experiment

269 3.2.1 *Ex vivo* erythrocyte fragility tests after dietary supplementation with annatto carotenoids

270 Dietary supplementation with BIX for 7 days increased the stability of erythrocytes to
271 osmotic hemolysis triggered by the *ex vivo* exposure to AAPH when compared with placebo
272 group, while supplementation with NBIX for 7 days did not prevent the fragility induced by
273 AAPH (Fig. 4A). Similarly, only the supplementation with BIX increased significantly the
274 erythrocyte membrane resistance against glucose-induced damage (Fig. 4B). However,
275 supplementation with both annatto carotenoids was able to reduce the osmotic fragility
276 induced by NaNO_2 when compared with the placebo group (Fig. 4C).

277

278 3.2.2 Oxidant and antioxidant status of erythrocytes after dietary supplementation with
279 annatto carotenoids and *ex vivo* exposure to membrane damage inducers

280 The occurrence of lipid oxidation, the content of reduced glutathione and the activity of
281 antioxidant enzymes were assessed after *ex vivo* exposure of erythrocytes to membrane
282 damage inducers to elucidate the mechanisms involved in the protective effect of annatto
283 supplementation. Erythrocyte incubation with AAPH, glucose or NaNO₂ increased
284 erythrocyte lipid peroxidation, as assessed by the increased levels of MDA. This increase in
285 the lipid peroxidation was accompanied by a decrease in the cellular content of GSH (Fig. 5).
286 BIX supplementation for 7 days was able to prevent the changes in MDA and GSH levels
287 triggered by all membrane damage inducers evaluated, whereas NBIX supplementation was
288 only able to prevent the changes that were induced by NaNO₂ in MDA and GSH levels (Fig
289 5C and 5F, respectively). Only NBIX supplementation for 7 days reduced erythrocyte MDA
290 basal levels (Fig 5A-C), whereas both carotenoids increased basal levels of GSH in
291 erythrocytes (Fig.5D-F).

292

293 Supplementation with BIX for 7 days did not modify basal SOD, CAT, or GPX activities.
294 NBIX supplementation for 7 days decreased basal SOD activity (Fig. 5A-C) but did not
295 modify basal activities of CAT or GPX (Fig. 5D-E and 5G-I, respectively). All membrane
296 damage inducers have increased erythrocyte SOD activity (Fig. 5A-C). Both BIX and NBIX
297 supplementation prevented this modification in SOD activity (Fig 5A-C). None of the
298 inducers used in this study were able to modify CAT activity (Fig. 5D-F). Only incubation
299 with NaNO₂ decreased GPX activity and neither BIX nor NBIX supplementation prevented
300 this alteration (Fig. 5I).

301 4. Discussion

302 In this study, the effect of annatto carotenoids on erythrocyte membrane resistance was
303 investigated for the first time. The experimental approach started with an *in vitro* investigation
304 and has been advanced to a clinical trial that comprised a 7-day dietary supplementation with
305 annatto carotenoids at doses compatible with the use of these carotenoids as food coloring
306 agents.

307 Initially, the antihemolytic properties of BIX and NBIX were investigated *in vitro* during the
308 co-incubation with the membrane damage inducers AAPH, glucose and NaNO₂. *In vitro*
309 exposure to BIX and NBIX increased erythrocyte membrane resistance *per se* and protected
310 against osmotic damage triggered all inducers of erythrocyte fragility. AAPH induces peroxy
311 radicals [9], while glucose induces superoxide production via glucose auto-oxidation and
312 NADPH oxidase activation [27]; and nitrite ions interact with oxyhemoglobin to form
313 methemoglobin with H₂O₂ production via reaction that is characterized by a lag period
314 followed by a rapid autocatalytic phase [28,29]. Despite dissimilarities in their respective
315 mechanisms, all inducers cause oxidative stress and lead to the lysis of erythrocytes. BIX and
316 NBIX have a long polyene chain, that confers singlet oxygen quenching and free radicals
317 scavenging activities [13]. Thus, the annatto carotenoids' long chain of conjugated double
318 bonds may be directly removing reactive species generated by the membrane damage
319 inducers, thereby protecting against hemolysis in the *in vitro* assay.

320 These findings opened the possibility that annatto carotenoids could also exhibit
321 antihemolytic properties *in vivo*. In fact, other carotenoids, namely lycopene, β-carotene and
322 lutein have been long known as dietary non-enzymatic antioxidants that constitute the first
323 line of defense against oxidative damage[9]. In this placebo-controlled clinical trial, healthy
324 subjects received annatto carotenoids (0.05 mg/kg b.w./day) during 7 days in a crossover
325 design.

326 Oxidative damage to the erythrocyte membrane is generally implicated in an increased lipid
327 peroxidation process, which reduces membrane fluidity and impairs the functioning of
328 membrane-bound enzymes and receptors and has been proposed as a general mechanism
329 involved in cell injury, leading to erythrocyte hemolysis [30]. In fact, in our study erythrocyte
330 incubation with AAPH, glucose or NaNO₂ induced cellular damage, evidenced by the
331 hemolysis occurrence. Data from the *ex vivo* experiment showed that this membrane damage
332 was accompanied by an increase in MDA levels, a main marker of lipid peroxidation,
333 decrease of GSH levels and increase in SOD activity. These data indicate that erythrocyte

334 antioxidant defenses were unable to cope with the oxidant challenge posed by the *ex vivo*
335 exposure to AAPH, glucose or NaNO₂. Antioxidant enzymes cooperate with non-enzymatic
336 antioxidants to counteract the oxidative cellular damage [3]. GSH is a tripeptide that plays a
337 major role in the non-enzymatic and enzymatic defense systems. Besides being a reducing
338 agent, GSH acts as the substrate for GPX to remove peroxides [26], which may explain the
339 decrease in GSH levels after exposure to the damage inducers. However, the first line of
340 enzymatic defense is SOD, which catalyzes the dismutation of superoxide anion into H₂O₂
341 that can be thereafter removed by GPX or CAT [25]. Superoxide anion scavenging prevents
342 its own oxidative effects and its conversion into peroxynitrite that is among the most powerful
343 oxidant species [31]. Thus, SOD increase can be regarded as an adaptive response to the
344 oxidant inducers, but this response was not able to prevent lipid peroxidation.

345 Erythrocytes from volunteers supplemented for 7 days with BIX showed increased stability to
346 the osmotic hemolysis triggered by all membrane damage inducers evaluated. This
347 antihemolytic effect of BIX was accompanied by the complete suppression of inducer-
348 triggered lipid peroxidation and by an increased concentration of GSH in erythrocytes. BIX
349 has been shown to activate the nuclear transcription erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) that
350 targets the antioxidant response elements (ARE) in DNA resulting in increased expression of
351 antioxidant enzymes including those involved in the synthesis of GSH [14,15,32]. However,
352 the increased erythrocyte levels of GSH observed after short-term annatto carotenoids
353 supplementation was likely related to a direct antioxidant effect of carotenoids that spares
354 endogenous GSH content rather than to an indirect effect via gene expression. Erythrocytes
355 are anucleate cells that do not make protein synthesis. Therefore, changes in the expression of
356 their enzymes should occur during cell formation in the bone marrow. Changes in gene
357 expression of nascent reticulocytes are unlikely to be detected after a 1-week treatment as
358 these cells have an average half-life 27,8 days [33]. The sparing of GSH content was observed
359 in after BIX and NBIX supplementation regardless of the exposure to the inducers. Thus, the
360 antioxidant effect of BIX and NBIX in the *ex vivo* study likely occurred during the treatment
361 and persisted even after the clearance of annatto carotenoids. Blood samples were collected
362 24 h after the last annatto intake, when annatto carotenoids are expected to have been
363 eliminated from bloodstream [34]. The complete clearance of BIX and NBIX has been
364 demonstrated to occur within 8 and 24 h after the intake of a single dose of annatto [16,34].
365 In contrast to BIX, the supplementation with NBIX for 7 days protected only against the
366 hemolysis induced by NaNO₂. In this case, the antihemolytic effect was also accompanied by

367 a reduction in MDA levels and an improvement in GSH levels. The different effects between
368 these structurally similar annatto carotenoids could be related to their different polarity. The
369 greater lipophilicity of BIX compared to NBIX, likely facilitates its incorporation into the
370 plasma membrane and the protective effect against membrane lipid oxidation. Contrasting
371 effects for BIX and NBIX have been previously reported in animal models [15].
372 Erythrocytes are the major cellular component of blood and are among the first cells exposed
373 to stressful xenobiotics that reach human body by inhalation or ingestion. Although
374 erythrocytes contain high levels of both enzymatic and non-enzymatic cytoplasmic
375 antioxidants [35], and erythrocyte membrane integrity can be affected by xenobiotics and
376 human diseases associated with oxidative stress [36]. Thus, dietary components that increase
377 erythrocyte stability may be useful to design functional foods for hemolytic anemia patients.
378 In addition, such bioactive dietary components can also be studied for designing novel
379 therapeutic drugs for anemia patients. The antihemolytic effect of annatto carotenoids has
380 been observed after a short-term supplementation with doses (0.05 mg/kg b.w./day) that are
381 higher than the estimated dietary exposure for annatto colorings. Data from JECFA [21] that
382 has been based on the typical use levels of annatto coloring additives reported by industry
383 estimated average consumption values ranging from 0.03 to 0.4 mg/day per capita (which
384 amounts to 0.5 to 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w./day for a 60-kg person) and 97.5th percentiles of consumption
385 of 1.5 mg /day per capita (which amounts to 0.025 mg/kg b.w./day for a 60-kg person).
386 However, it is important to emphasize that the dose used in this study is expected to be safe
387 even for longer exposure periods as it amounted to only 0.4% and 8.3% of the ADI
388 established by JECFA for BIX and NBIX, respectively.

389

390 **5. Conclusion**

391 We demonstrated for the first time that dietary supplementation with annatto food coloring
392 formulations attenuates experimentally induced hemolysis and oxidative modification of
393 lipids in erythrocytes, possibly by improving the erythrocyte antioxidant status. BIX had a
394 greater antihemolytic efficacy than NBIX and could be explored for the development of
395 functional foods or novel therapeutic drugs for patients with hemolytic anemia associated to
396 oxidative stress mechanisms.

397

398

399 **Acknowledgments**

400 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
401 Superior, Brazil (CAPES) (grant number 001), and Fundação de Amparo a Pesquisa do
402 Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (grant 17/2551-0000949-5). The authors are
403 thankful to Dr. Carlos Fernando de Mello and Dr. Felix Antunes Soares for allowing the use
404 of microplate readers.

405 **References**

- 406 [1] Riaz N, Wolden SL, Gelblum DY, Eric J. Anemia: Progress in molecular mechanisms
407 and therapy 2016;118:6072–8. doi:10.1002/cncr.27633.Percutaneous.
- 408 [2] Kuhn V, Diederich L, Keller TCS, Kramer CM, Lückstädt W, Panknin C, et al. Red
409 blood cell function and dysfunction: redox regulation, nitric oxide metabolism, anemia.
410 *Antioxid Redox Signal* 2017;26:718–42. doi:10.1089/ars.2016.6954.
- 411 [3] Çimen MYB. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta*
412 2008;390:1–11. doi:10.1016/j.cca.2007.12.025.
- 413 [4] Paraiso LF, Gonçalves-E-Oliveira AFM, Cunha LM, De Almeida Neto OP, Pacheco
414 AG, Araújo KBG, et al. Effects of acute and chronic exercise on the osmotic stability of
415 erythrocyte membrane of competitive swimmers. *PLoS One* 2017;12:1–13.
416 doi:10.1371/journal.pone.0171318.
- 417 [5] World Health Organization. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anemia
418 and assessment of severity. *Miner Nutr Inf Syst World Heal Organ* 2013:1–6. doi:2011.
- 419 [6] Dhaliwal G, Cornett PA, Tierney JR LM. Review dx hemolytic anemia. *Am Fam*
420 *Physician* 2004;69:2599–606.
- 421 [7] Çimen MYB, Çimen OB, Kacmaz M, Ozturk HS, Yorgancioglu R, Durak I.
422 Oxidant/antioxidant status of the erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin*
423 *Rheumatol* 2000;19:275–7.
- 424 [8] Kaulmann A, Bohn T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress-implications of
425 cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutr Res* 2014;34:907–
426 29. doi:10.1016/j.nutres.2014.07.010.
- 427 [9] Chisté RC, Freitas M, Mercadante AZ, Fernandes E. Carotenoids inhibit lipid
428 peroxidation and hemoglobin oxidation, but not the depletion of glutathione induced by ROS
429 in human erythrocytes. *Life Sci* 2014;99:52–60. doi:10.1016/j.lfs.2014.01.059.
- 430 [10] Stringheta PC, Silva PI, Costa AGV. Annatto/Urucum— Bixa orellana. *Exot Fruits*
431 2018;23–30. doi:10.1016/b978-0-12-803138-4.00006-x.
- 432 [11] Tocchini L, Mercadante AZ. Extração e determinação, por clae, de bixina e norbixina
433 em coloríficos. *Ciência e Tecnol Aliment* 2001;21:310–3. doi:10.1590/S0101-
434 20612001000300010.
- 435 [12] Bautista ARPL, Miranda MS, Batista MS, Moreira ELT, Silva IM, Gomes ICS. Oral
436 toxicity assessment of annatto in rats. *Rev Bras Ciencias Farm J Pharm Sci* 2004;40:229–33.
437 doi:10.1590/s1516-93322004000200012.

- 438 [13] Chisté RC, Mercadante AZ, Gomes A, Fernandes E, Lima JLF da C, Bragagnolo N. In
439 vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen
440 species. *Food Chem* 2011;127:419–26. doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.139.
- 441 [14] Somacal S, Figueiredo CG, Quatrin A, Ruviaro AR, Conte L, Augusti PR, et al. The
442 antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the
443 improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects. *Mol Cell*
444 *Biochem* 2015;403:243–53. doi:10.1007/s11010-015-2354-x.
- 445 [15] Roehrs M, Figueiredo CG, Zanchi MM, Bochi GV, Moresco RN, Quatrin A, et al.
446 Bixin and norbixin have opposite effects on glycemia, lipidemia, and oxidative stress in
447 streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Endocrinol* 2014;2014. doi:10.1155/2014/839095.
- 448 [16] Roehrs M, Conte L, da Silva DT, Duarte T, Maurer LH, de Carvalho JAM, et al.
449 Annatto carotenoids attenuate oxidative stress and inflammatory response after high-calorie
450 meal in healthy subjects. *Food Res Int* 2017. doi:10.1016/j.foodres.2017.08.005.
- 451 [17] Conte L, Somacal S, Nichelle SM, Rampelotto C, Robalo SS, Roehrs M, et al. Short-
452 term bixin supplementation of healthy subjects decreases the susceptibility of LDL to Cu²⁺ -
453 induced oxidation ex vivo. *J Nutr Metab* 2019;2019:1–13. doi:10.1155/2019/9407069.
- 454 [18] Souza LF, Pagno CH, Medeiros NDS, Barbosa S, Dos Santos PCP, Rios A, et al. The
455 effect of the carotenoid bixin and annatto seeds on hematological markers and nephrotoxicity
456 in rats subjected to chronic treatment with cisplatin. *Brazilian J Pharmacogn* 2016;26:446–50.
457 doi:10.1016/j.bjp.2016.03.005.
- 458 [19] Parpart A, Lorenz P, Parpart E, Gregg J, Chase A. The osmotic resistance (fragility) of
459 human red cells. *J Clin Invest* 1947;26:636–40. doi:10.1172/JCI101847.
- 460 [20] Dacie JV, Lewis SM. *Practical Hematology* 1975;5th ed. Churchill Livingstone,
461 London.
- 462 [21] Chikezie PC, Uwakwe a a, Monago CC. Comparative osmotic fragility of three
463 erythrocyte genotypes (HbAA , HbAS and HbSS) of male participants administered with
464 five antimalarial drugs. *African J Biochem Res* 2010;4:57–64.
- 465 [22] Additives F. Evaluation of certain food additives and contaminants. Eightieth report of
466 the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *World Health Organ Tech Rep*
467 *Ser* 2016:1–114.
- 468 [23] Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, et al. Rapid
469 quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-
470 visible detection. *J Pharm Biomed Anal* 2007;43:619–24. doi:10.1016/j.jpba.2006.07.030.

- 471 [24] Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced
472 glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976;74:214–26. doi:10.1016/0003-2697(76)90326-2.
- 473 [25] Fridovich HPM and I. The role of superoxide anion in the epinephrine and a simple
474 assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170–5.
- 475 [26] Aebi H. Oxygen radicals in biological systems. *Methods Enzymol* 1984;105:121–6.
476 doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- 477 [27] Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization
478 of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;3:158–69.
- 479 [28] Johnson RM, Goyette G, Ravindranath Y, Ho YS. Hemoglobin autoxidation and
480 regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. *Free Radic Biol Med* 2005;39:1407–
481 17. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.07.002.
- 482 [29] Zavodnik IB, Lapshina EA, Rekawiecka K, Zavodnik LB, Bartosz G, Bryszewska M.
483 Membrane effects of nitrite-induced oxidation of human red blood cells. *Biochim Biophys*
484 *Acta - Biomembr* 1999;1421:306–16. doi:10.1016/S0005-2736(99)00136-4.
- 485 [30] Ansari FA, Ali SN, Mahmood R. Sodium nitrite-induced oxidative stress causes
486 membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways
487 in human erythrocytes. *Toxicol Vitr* 2015;29:1878–86. doi:10.1016/j.tiv.2015.07.022.
- 488 [31] Diederich L, Suvorava T, Sansone R, Keller TCS, Barbarino F, Sutton TR, et al. On
489 the effects of reactive oxygen species and nitric oxide on red blood cell deformability. *Front*
490 *Physiol* 2018;9:1–14. doi:10.3389/fphys.2018.00332.
- 491 [32] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology & Medicine*. Oxford Univ
492 Press 2015;5 ed:961. doi:10.1093 / acprof: oso / 9780198717478.001.0001.
- 493 [33] Tao S, Park SL, de la Vega MR, Zhang DD, Wondrak GT. Systemic administration of
494 the apocarotenoid bixin protects skin against solar UV-induced damage through activation of
495 Nrf2. *Free Radic Biol Med* 2015;89:690–700. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.028.
- 496 [34] Franco RS. Measurement of red cell lifespan and aging. *Transfus Med Hemotherapy*
497 2012;39:302–7. doi:10.1159/000342232.
- 498 [35] Levy LW, Edmundo R, Navarrete S, Watkins RH. Bixin and norbixin in human
499 plasma: Determination and study of the absorption of a single dose of annatto food color.
500 *Analyst* 1997;122:977–80. doi:10.1039/a701304c.
- 501 [36] Pandey KB, Rizvi SI. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomed Pap*
502 2011;155:131–6. doi:10.5507/bp.2011.027.

503 [37] Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of
504 natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and
505 glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005;16:577–86.
506 doi:10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.

507

508

509

510 **Figure 1** – Chemical structure of bixin and norbixin and representative scheme of in vitro
511 design.

512 **Figure 2** – Representative figure of treatment scheme followed by volunteers.

513 **Figure 3** - In vitro effect of bixin (A-C) and norbixin (D-F) on erythrocyte osmotic fragility
514 after AAPH, glucose or NaNO₂ exposure. Data are shown as the means ± S.E.M. *Different
515 from respective control group (0 μM; P<0.05). #Difference of inducer absence/presence in the
516 same concentration (P<0.05) AAPH: 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride.

517 **Figure 4** - Effect of carotenoid supplementation on erythrocyte osmotic fragility after AAPH
518 (A), glucose (B) or NaNO₂ (C) ex vivo exposure. Data are shown as the means ± S.E.M.
519 *Different from respective placebo group (P<0.05). AAPH: 2,2'-Azobis(2-amidinopropane)
520 dihydrochloride.

521 **Figure 5** - Effect of carotenoid supplementation on MDA (A-C) and GSH (D-F) levels in red
522 blood cells after AAPH, glucose or NaNO₂ ex vivo exposure. Data are shown as the means ±
523 S.E.M. *Different from respective placebo group (P<0.05). #Difference of inducer
524 absence/presence in the same group (P<0.05). MDA: malondialdehyde. AAPH: 2,2'-Azobis(2-
525 amidinopropane) dihydrochloride.

526 **Figure 6** - Effect of bixin and norbixin supplementation on superoxide dismutase (A-C),
527 catalase (D-E), and glutathione peroxidase (G-I) activities in erythrocytes after AAPH, glucose
528 or NaNO₂ ex vivo exposure. Data are shown as the means ± S.E.M. *Different from respective
529 placebo group (P<0.05). #Difference of inducer absence/presence in the same group (P<0.05).
530 AAPH: 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride.

FIGURE 1

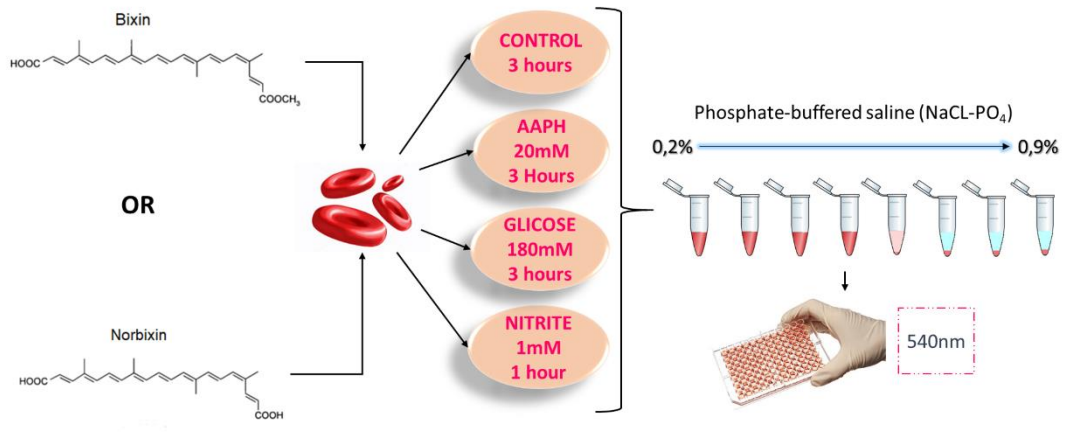


FIGURE 2

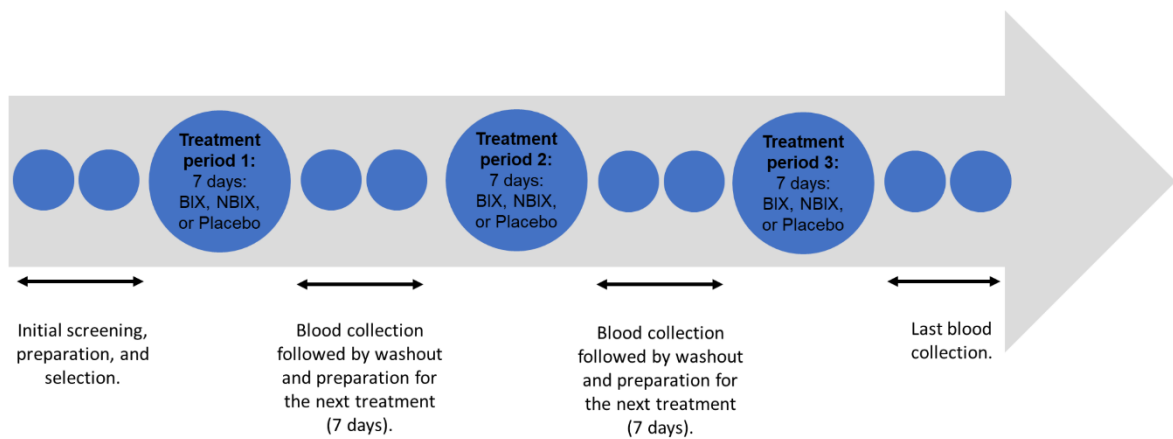


FIGURE 3

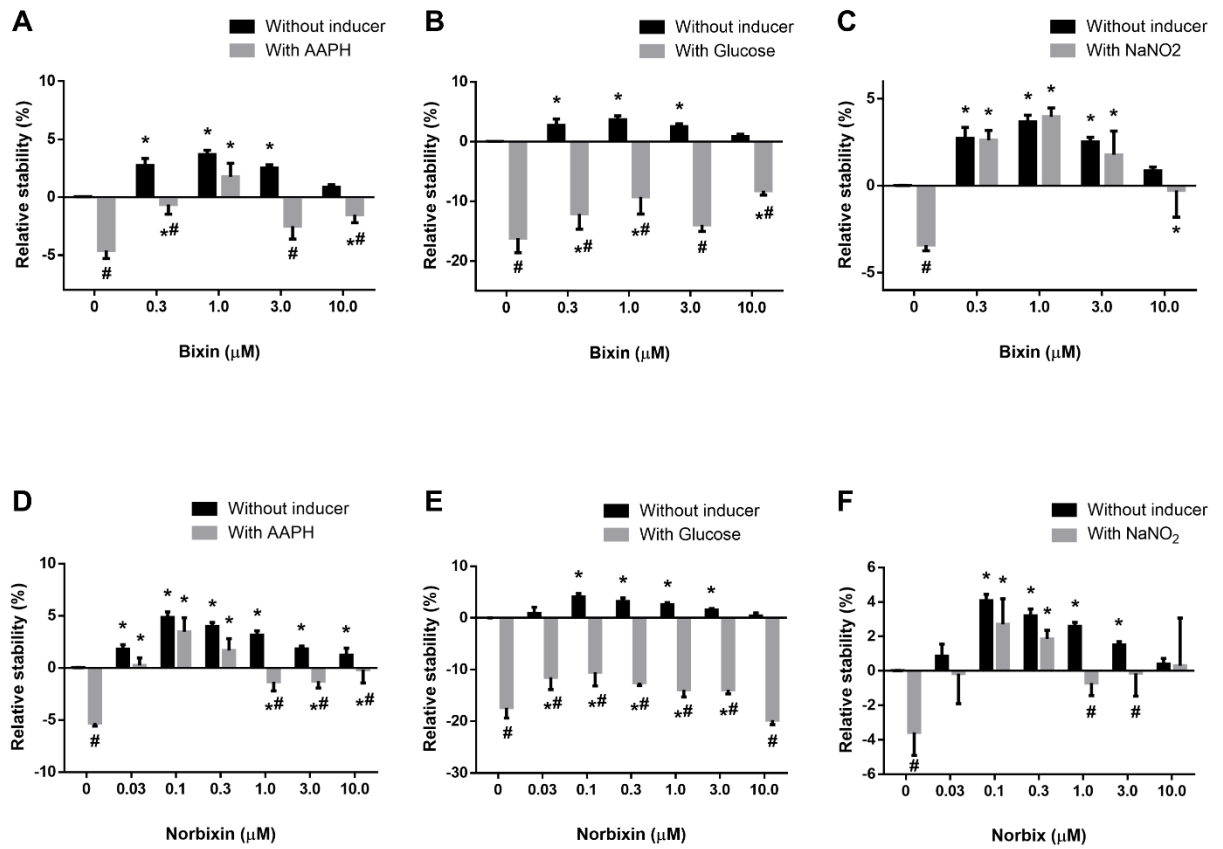


FIGURE 4

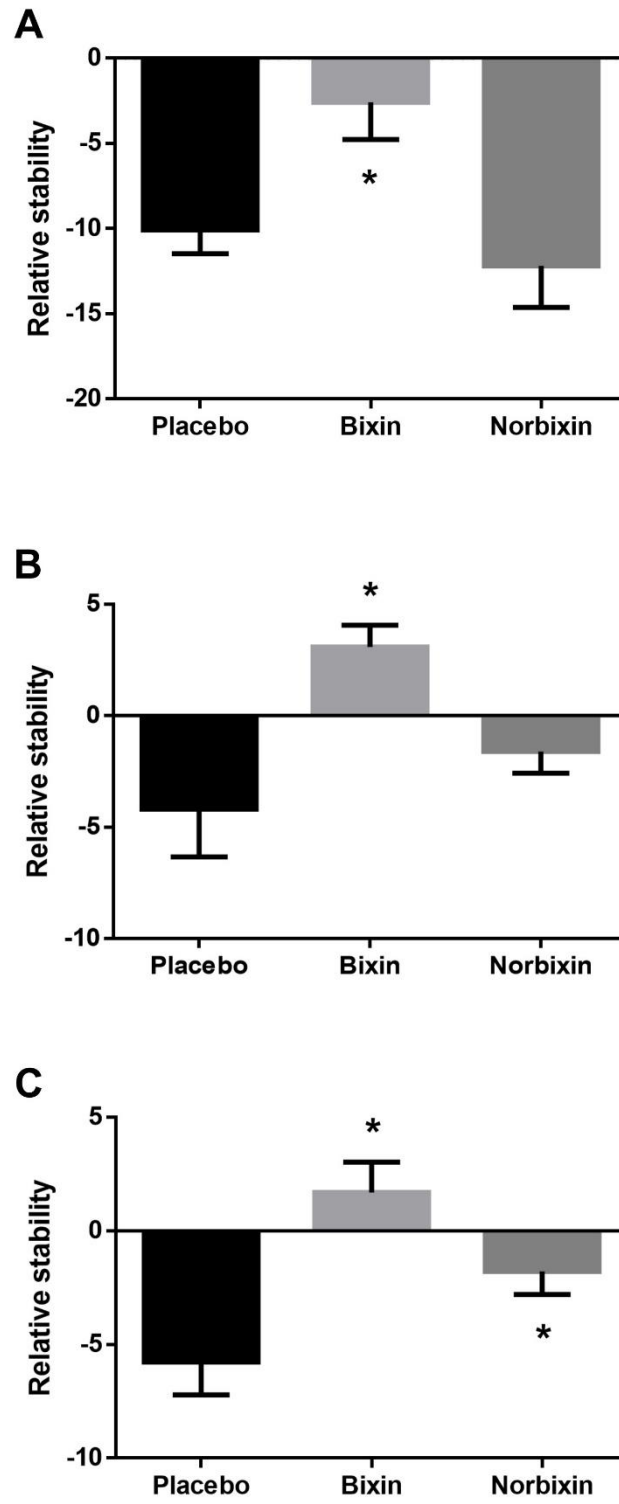


FIGURE 5

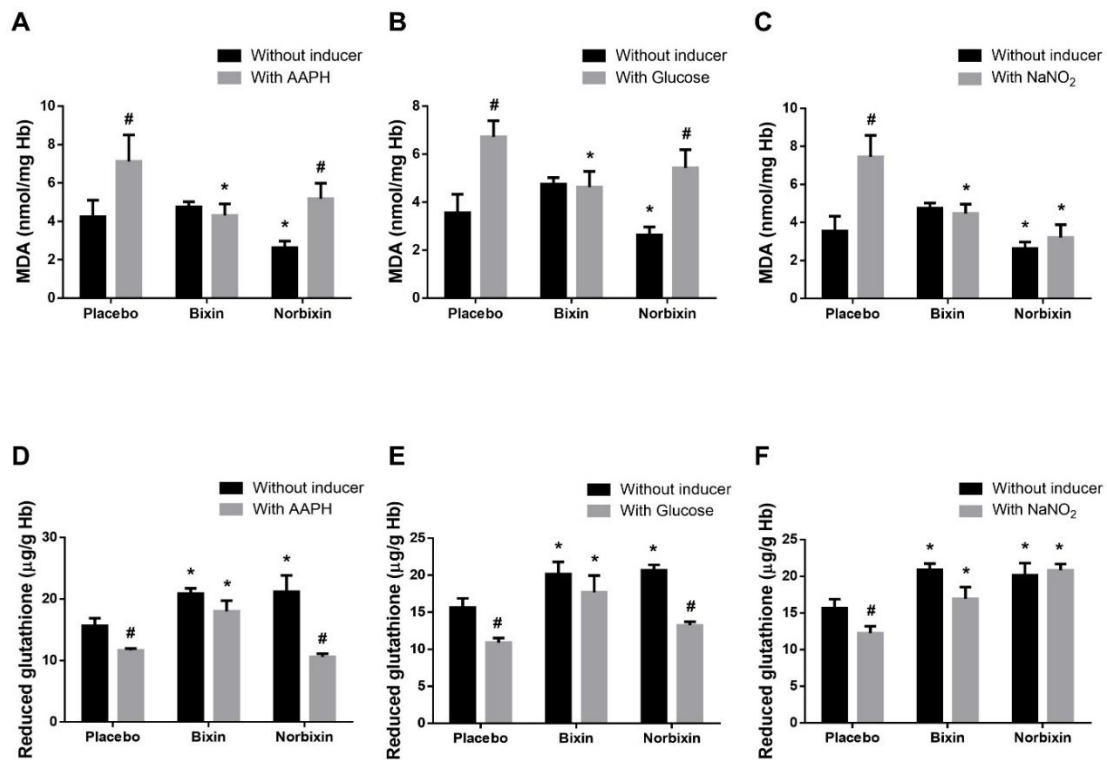
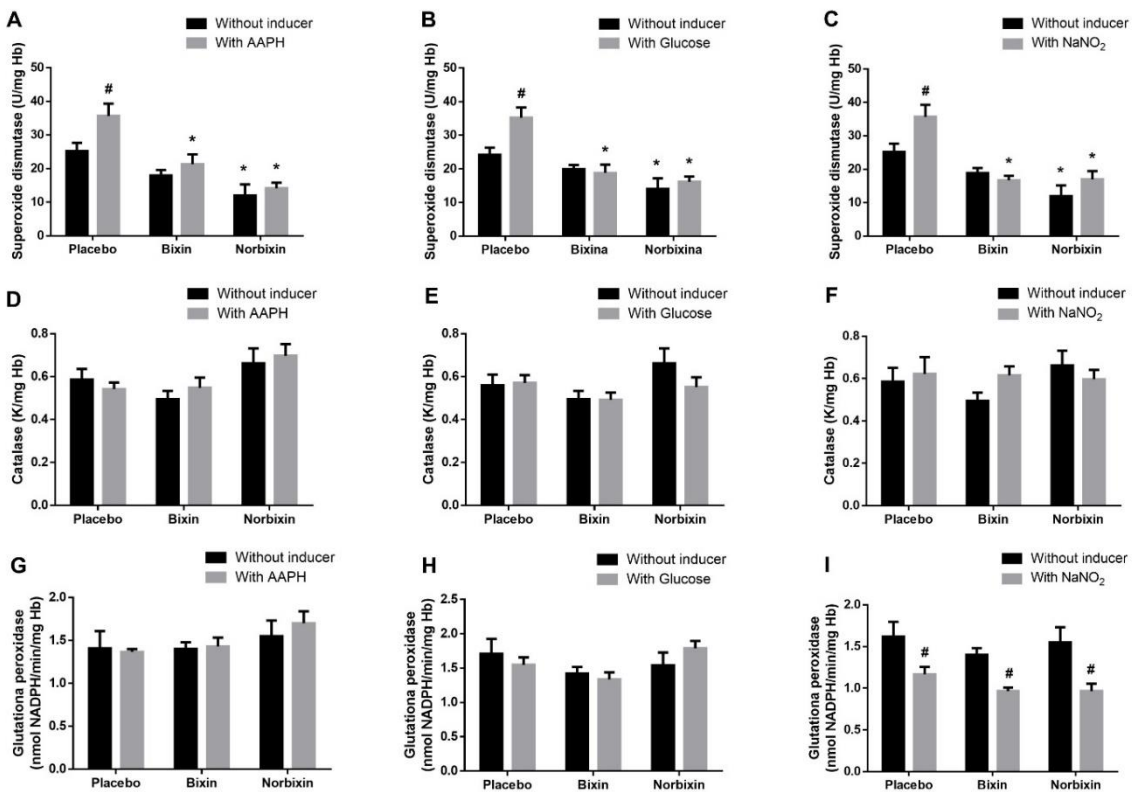


FIGURE 6



3. CONCLUSÃO

Neste estudo, os efeitos *in vitro* e *ex vivo* dos carotenoides BIX e NBIX sobre a fragilidade eritrocitária humana foram demonstrados pela primeira vez. Analisando os resultados obtidos podemos concluir que:

- A incubação de eritrócitos com BIX ou NBIX aumentou a resistência da membrana eritrocitária.

- A suplementação com BIX reduziu a fragilidade da membrana eritrocitária induzida por AAPH, nitrito e glicose, mas a suplementação com NBIX preveniu apenas a fragilidade da membrana eritrocitária induzida pelo nitrito.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of AOAC International. **Association of Official Analysis Chemists International**, v. 1, n. Volume 1, p. CD-ROM, 2007.
- BAUTISTA, A. R. P. L.; MIRANDA, M. S.; BATISTA, M. S.; et al. Oral toxicity assessment of annatto in rats [Avaliação da toxicidade oral subcrônica da bixina para ratos]. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 229–233, 2004.
- BAYNES, J. W. Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes. **Diabetes**, v. 40, n. 4, p. 405–412, 1991.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- CHIKEZIE, P. C.; UWAKWE, A A; MONAGO, C. C. Comparative osmotic fragility of three erythrocyte genotypes (HbAA , HbAS and HbSS) of male participants administered with five antimalarial drugs. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 4, n. March, p. 57–64, 2010.
- CHISTÉ, R. C.; FREITAS, M.; MERCADANTE, A. Z.; FERNANDES, E. Carotenoids inhibit lipid peroxidation and hemoglobin oxidation, but not the depletion of glutathione induced by ROS in human erythrocytes. **Life Sciences**, v. 99, n. 1–2, p. 52–60, 2014. Elsevier Inc.
- ÇIMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v. 390, n. 1–2, p. 1–11, 2008.
- ÇIMEN, M. Y. B.; ÇIMEN, O. B.; KACMAZ, M.; et al. Oxidant / Antioxidant Status of the Erythrocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 19, p. 275–277, 2000.
- CONTE, L.; SOMACAL, S.; NICHELLE, S. M.; et al. Short-Term Bixin Supplementation of Healthy Subjects Decreases the Susceptibility of LDL to Cu²⁺-Induced Oxidation Ex Vivo . **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2019, p. 1–13, 2019.
- DHALIWAL, G.; CORNETT, P. A.; TIERNEY JR, L. M. Review dx hemolytic anemia. **American Family Physician**, v. 69, n. 11, p. 2599–2606, 2004.
- DOMENICA CAPPELLINI, M.; MOTTA, I. Anemia in Clinical Practice-Definition and Classification: Does Hemoglobin Change With Aging? **Seminars in Hematology**, v. 52, n. 4, p. 261–269, 2015.
- EMANUELLI, T.; AUGUSTI, P. R.; ROEHRS, M. Protective effects of carotenoids in cardiovascular disease and diabetes. **Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health: Second Edition**, v. 1, p. 347–381, 2017.

ESHGHI, S.; VOGELEZANG, M. G.; HYNES, R. O.; GRIFFITH, L. G.; LODISH, H. F. Alpha4beta1 integrin and erythropoietin mediate temporally distinct steps in erythropoiesis: integrins in red cell development. **The Journal of cell biology**, v. 177, n. 5, p. 871–80, 2007.

GARRATTY, G.; PETZ, L. D. Drug-induced immune hemolytic anemia. **The American Journal of Medicine**, v. 58, n. 3, p. 398–407, 1975.

GRABMANN, J. Terpenoids as Plant Antioxidants. **Vitamins & Hormones**, v. 72, p. 505–535, 2005. Academic Press.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology & Medicine. **Oxford University Press**, v. 5 ed, p. 961, 2015.

HEYNEN, M. J.; TRICOT, G.; VERWILGHEN, R. L. Autophagy of mitochondria in rat bone marrow erythroid cells Relation to nuclear extrusion. **Cell and Tissue Research**, v. 239, n. 1, p. 235–239, 1985.

HONG, C. I.; DE, N. C.; TRITSCH, G. L.; CHHEDA, G. B. Synthesis and biological activities of some N4-substituted 4-aminopyrazolo[3,4-d]pyrimidines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 555–558, 1976.

KALRA, E. K. Nutraceutical-definition and introduction. **AAPS PharmSci**, v. 5, n. 3, p. 27–28, 2003.

KAULMANN, A.; BOHN, T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress-implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. **Nutrition Research**, v. 34, n. 11, p. 907–929, 2014. Elsevier Inc.

KENT, G.; MINICK, O. T.; VOLINI, F. I.; ORFEI, E. Autophagic vacuoles in human red cells. **American Journal of Pathology**, v. 48, n. 5, p. 831–857, 1966.

KUHN, V.; DIEDERICH, L.; KELLER, T. C. S.; et al. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 26, n. 13, p. 718–742, 2017.

LIANG, R.; CAMPRECIÓS, G.; KOU, Y.; et al. A Systems Approach Identifies Essential FOXO3 Functions at Key Steps of Terminal Erythropoiesis. (H. S. Scott, Ed.) **PLOS Genetics**, v. 11, n. 10, p. e1005526, 2015.

MEHDI, U.; TOTO, R. D. Anemia, diabetes, and chronic kidney disease. **Diabetes Care**, v. 32, n. 7, p. 1320–1326, 2009.

OBOH, G.; AKOMOLAFE, T. L.; ADEFEGHA, S. A.; ADETUYI, A. O. Inhibition of cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat brain by polar and non-polar extracts of Annatto (*Bixa orellana*) seeds. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, n. 3, p. 257–262, 2011. Elsevier.

ORKIN, S. H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. **Nature Reviews Genetics**, v. 1, n. 1, p. 57–64, 2000.

PACKER, L. **Handbook of Antioxidants**. 2001.

PARAISO, L. F.; GONÇALVES-E-OLIVEIRA, A. F. M.; CUNHA, L. M.; et al. Effects of acute and chronic exercise on the osmotic stability of erythrocyte membrane of competitive swimmers. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–13, 2017.

PARPART, A.; LORENZ, P.; PARPART, E.; GREGG, J.; CHASE, A. The osmotic resistance (fragility) of human red cells. **J Clin Invest**, v. 26, p. 636–40, 1947.

PÉREZ, M.; BINDERS, B. L. R. CAROTENOIDS, Nutrition, Health, and Technology. **WD info**, v. 3, n. 2, p. 2004, 2003.

REIS, J. S.; VELOSO, C. A.; MATTOS, R. T.; PURISH, S.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A. [Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes]. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 52, n. 7, p. 1096–105, 2008.

RIAZ, N.; WOLDEN, S. L.; GELBLUM, D. Y.; ERIC, J. Anemia: Progress in molecular mechanisms and therapy. , v. 118, n. 24, p. 6072–6078, 2016.

RODRIGUES, S. M.; SOARES, V. L. F.; OLIVEIRA, T. M. DE; et al. Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols, polysaccharides, and pigments of annatto (*Bixa orellana* L.). **Molecular Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 220–224, 2007.

ROEHRS, M.; CONTE, L.; SILVA, D. T. DA; et al. Annatto carotenoids attenuate oxidative stress and inflammatory response after high-calorie meal in healthy subjects. **Food Research International**, 2017.

ROEHRS, M.; FIGUEIREDO, C. G.; ZANCHI, M. M.; et al. Bixin and norbixin have opposite effects on glycemia, lipidemia, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, 2014.

SANDOVAL, H.; THIAGARAJAN, P.; DASGUPTA, S. K.; et al. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. **Nature**, v. 454, n. 7201, p. 232–235, 2008.

SOMACAL, S. POTENCIAL ANTIATEROGÊNICO DA BIXINA IN VIVO E IN VITRO. , 2016.

SOMACAL, S.; FIGUEIREDO, C. G.; QUATRIN, A.; et al. The antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 403, n. 1–2, p. 243–253, 2015.

SOUZA, L. F.; PAGNO, C. H.; MEDEIROS, N. D. S.; et al. The effect of the carotenoid bixin and annatto seeds on hematological markers and nephrotoxicity in rats subjected to chronic treatment with cisplatin. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 4, p. 446–450, 2016. Sociedade Brasileira de Farmacognosia.

STRINGHETA, P. C.; SILVA, P. I.; COSTA, A. G. V. Annatto/Urucum— *Bixa orellana*. **Exotic Fruits**, p. 23–30, 2018.

SURGENOR, D. (ED.). **The Red Blood Cell**. 2nd ed. Elsevier, 1974.

TANUMIHARDJO S. **Carotenoids and Human Health**. 2013.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração E Determinação, Por Clae, De Bixina E Norbixina Em Coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 310–313, 2001.

URRY, L. A.; CAIN, M. L.; WASSERMAN, S. A.; et al. Circulation and Gas Exchange. **Cambell biology**. 11th ed., p.919–949, 2017. Pearson Education, Inc.

WANG, Y. J.; PAN, M. H.; CHENG, A. L.; et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 15, n. 12, p. 1867–76, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Haemoglobin Concentrations for the Diagnosis of Anaemia and Assessment of Severity. **Mineral Nutrition Information System, World Health Organization**, p. 1–6, 2013.

YAZDANBAKHSI, K.; LOMAS-FRANCIS, C.; REID, M. E. Blood groups and diseases associated with inherited abnormalities of the red blood cell membrane. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 14, n. 4, p. 364–374, 2000.

ZIVOT, A.; LIPTON, J. M.; NARLA, A.; BLANC, L. Erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017. **Molecular Medicine**, v. 24, n. 1, p. 11, 2018.

5. ANEXOS

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: **Efeito dos carotenoides do urucum sobre a fragilidade eritrocitária e o estatus antioxidante *in vitro* e *ex vivo***

Pesquisador responsável: Dr^a Tatiana Emanuelli

Pesquisadores participantes: Anissa Algara Beni, Sabrina Somacal, Lisiane Conte, Renata Fritzsche Rodrigues, Miguel Roehrs.

Instituição/Departamento: Universidade Federal de Santa Maria/Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Telefone e endereço postal completo: (55) 3220-8547. Avenida Roraima, 1000, prédio 46 (NIDAL), sala 107, 97105-970 - Santa Maria - RS.

Local da coleta de dados: NIDAL

Endereço eletrônico:

Eu, Tatiana Emanuelli, responsável pela pesquisa “**Efeito dos carotenoides do urucum sobre a fragilidade eritrocitária e o estatus antioxidante *in vitro* e *ex vivo***”, e os demais membros da equipe de pesquisa, o convidamos a participar como voluntário deste estudo. Nós nos responsabilizamos em lhe fornecer informações sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa, além dos benefícios esperados dessa participação e apresentar providências e cautelas empregadas para evitar ou reduzir efeitos e condições adversas que possam causar dano, considerando características e contexto do participante da

pesquisa (Resolução 466/12). Você precisa decidir se quer participar deste estudo ou não. Pedimos que não se apresse para tomar esta decisão. Leia com atenção e cuidado o que se segue e em caso de dúvida, pergunte ao responsável pela pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de você aceitar fazer parte do estudo, pedimos que você assine ao final deste documento, que está disponível em duas vias. Uma via é sua e a outra é do pesquisador responsável. Você tem garantida a possibilidade de não aceitar participar ou de retirar sua permissão a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo pela sua decisão.

Esta pesquisa pretende avaliar se o consumo de bixina e norbixina, por indivíduos saudáveis pode prevenir ou retardar eventos relacionados à fragilidade eritrocitária, evitando o desenvolvimento de anemia. Acreditamos que ela seja importante porque estudos em animais, mostraram que esses compostos são efetivos para diversas patologias. Caso você concorde em participar, você deverá responder um questionário para verificarmos se você se poderá ser incluído na pesquisa. Se você for incluído na pesquisa, além de responder ao questionário, você será convidado a realizar uma coleta de sangue (10 mL), que será realizada no Núcleo de Desenvolvimento de Análises Laboratoriais (NIDAL), pela manhã, em jejum de 8 h em data previamente acertada em comum acordo. Essa coleta será necessária para avaliar o seu estado de saúde atual através de exames de sangue. Nessa mesma ocasião será medida a sua altura e verificado o seu peso e a pressão arterial.

Caso o seu perfil seja adequado para inclusão no estudo, nós o convidaremos a consumir uma cápsula/dia contendo bixina, norbixina ou placebo durante 7 dias. Na semana anterior a cada tratamento (período de *washout*) e durante o mesmo, você será instruído a evitar o consumo de alimentos ricos em pigmentos carotenoides (coloração amarela, laranja e vermelha) ou urucum, como tomate, cenoura, molhos, embutidos, salgadinhos, biscoitos, condimentos; bebidas alcoólicas e alimentos gordurosos. Uma nutricionista fará um guia que irá auxiliá-lo na escolha de alimentos que se adequem ao quesito acima e a sua rotina. Serão realizadas coletas de 30 mL no início e final de cada tratamento (6 coletas no total), além de uma coleta adicional no 6º dia de cada tratamento (5 mL). As coletas de sangue serão realizadas por um profissional habilitado e experiente na função. Além disso, durante os períodos de *washout* e tratamento, você será orientado a fazer um diário alimentar (material fornecido pelos pesquisadores), onde será anotado quais alimentos você consumiu, a quantidade e o horário (café da manhã às 8 horas, por exemplo), que será entregue ao término de cada período para os pesquisadores.

Riscos individuais e possibilidade de exclusão

A coleta de sangue é um procedimento de baixo risco e desconforto, mas o voluntário poderá sentir dor no local da picada da agulha assim como formação de manchas roxas, causados pela coleta de sangue. Caso isso ocorra, será realizada massagem com pomada ou gel para remoção das machas, sem nenhum custo.

A bixina, norbixina e o licopeno são compostos carotenoides naturais dos vegetais que são comumente usados como corantes na fabricação de alimentos. As doses utilizadas neste trabalho são consideradas seguras para ingestão humana pela Autoridade Europeia de Segurança de Alimentos.

Após o jejum de 8 horas, algumas pessoas podem ter uma redução na glicose e pressão sanguíneas, sendo que nestes casos a pessoa receberá todos os cuidados necessários e será suspensa sua participação neste dia. Se a mesma pessoa apresentar este evento novamente será encaminhada a atendimento médico.

Em caso de algum outro mal-estar ou problema relacionado com a pesquisa, você terá direito à assistência gratuita que será prestada e poderá retirar-se da pesquisa a qualquer momento.

Ressaltamos que o voluntário que se sentir constrangido ao responder ao questionário ou em qualquer momento da pesquisa, poderá a qualquer momento abandonar este estudo sem prejuízo algum a ambas as partes.

Os gastos necessários para a sua participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica, também, garantida indenização em casos de danos comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa.

Não há benefício direto para o participante. Este estudo experimental testa a possibilidade de que os carotenoides possam auxiliar na prevenção da aterosclerose. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

Período de participação

A sua participação na pesquisa terá duração de 10 semanas, em 7 semanas das quais você deverá passar pelos períodos de *washout* e tratamento. As 3 semanas adicionais correspondem a uma semana de intervalo entre cada tratamento (3 semanas), em que você não necessitará seguir recomendações especiais na dieta. Você poderá retirar-se da pesquisa em qualquer momento, antes ou durante a mesma, sem penalidades ou prejuízo.

Confidencialidade

Se você concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei ou por sua solicitação, somente o pesquisador, a equipe do estudo, o Comitê de Ética independente terão acesso a suas informações para verificar as informações do estudo.

O material coletado e os seus dados serão utilizados somente para esta pesquisa, podendo ser publicados apenas em eventos ou publicações, sem a identificação dos voluntários; e ficarão guardados com o pesquisador pelo período de cinco anos, após o qual serão destruídos.

Garantia de acesso

Durante todo o período da pesquisa você terá a possibilidade de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento. Para isso, entre em contato com algum dos pesquisadores ou com o Comitê de Ética em Pesquisa.

Consentimento da participação da pessoa como sujeito

Eu, _____, portador de RG _____, após a leitura ou a escuta da leitura deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, estou suficientemente informado sobre o estudo “**Efeito dos carotenoides do urucum sobre a fragilidade eritrocitária e o estatus antioxidante in vitro e ex vivo**”; ficando claro que a minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade. Diante do exposto e de espontânea vontade, expresso minha concordância em participar deste estudo e assino este termo em duas vias, uma das quais foi-me entregue.

Local e data:

Nome e assinatura do voluntário:

Preenchimento do pesquisador:

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste voluntário da pesquisa para a participação neste estudo.

Santa Maria, ____ de _____ de 2018.

Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE:

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato:
Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM - Cidade Universitária - Bairro Camobi, Av. Roraima,
nº1000 - CEP: 97.105.900 Santa Maria – RS. Telefone: (55) 3220-9362 – Fax: (55)3220-8009
Email: comiteeticapesquisa@smail.ufsm.br. Web: www.ufsm.br/cep

ANEXO 2

QUESTIONÁRIO

Nome: _____

Idade: _____ Peso: _____ Altura: _____

Índice de massa corporal [peso/(altura)²]: _____

Pressão arterial: _____

Temperatura corporal: _____

- Faz exercícios físicos?

 1x por semana 2x por semana 3x por semana 4x ou mais por semana não faço exercícios

- Teve alguma doença inflamatória, viral ou bacteriana nas últimas 4 semanas?

 Sim Não

Qual? _____ Período: _____

- Tem alguma doença crônica? Sim Não.

Qual? _____

- Alguma doença crônica na família? Sim Não.

Qual? _____

- Você tem sentido nos últimos dias os seguintes sintomas (dores de cabeça, náuseas, ansiedade, taquicardia, dores nas juntas, cólicas estomacais, desmaio, convulsão, infecção urinária)?

 Sim Não

Quais? _____

- Teve febre nos últimos dias?

 Sim Não

Quando? _____

- Em relação ao consumo de álcool:

 Bebe 1 ou 2x por semana Bebe 3 ou 4x Bebe diariamente

- Você consome frutas e vegetais?

 Diariamente 1 a 2 x por semana 3 a 5 x por semana

- Tem alguma alergia?

 Sim Não

Qual? _____

- Você costuma alimentar-se de alimentos industrializados que possuem a cor vermelho-alaranjado? Ex: embutidos, massas, queijos, iogurtes.

Sim Não

Qual(is)? _____

- Fez algum procedimento cirúrgico nos últimos 12 meses?

Sim Não

Qual (is)? _____ Quando? _____

- Apresentou alguma alteração em exames laboratoriais (glicose, colesterol...) nos últimos 6 meses?

Não Sim

Qual (is)? _____

- Usa algum tipo de medicamento ou suplemento (polivitamínicos, whey protein, etc.)?

Não Sim

Qual (is)? _____

Somente para voluntários do sexo feminino:

-Você está em período menstrual?

Não Sim

- Normalmente você tem redução de hematócrito e hemoglobina no período menstrual?

Não Sim Não sabe informar

Nome e Assinatura do voluntário:

_____/_____/2018

FIGURA 1

| Request for educational | |
|-------------------------------------|--|
| Submit a permissions request | Request for educational |
| Requester's contact information | |
| Title | Miss |
| First name | Anissa |
| Last name | Beni |
| Email | anissa.algara@gmail.com |
| Company/Institution | Federal University of Santa Maria |
| Address | : Avenida Porfêto Evando Behr : 5952 : Santa Maria : Brazil : 97110-800 |
| Country of requester | Brazil |
| Phone number | 55981591589 |
| Requester's reference number | |
| Pearson's Product Information | |
| Origin of title / product | United States |
| ISBN / Product Identifier | 9780134093413 |
| Title | Campbell Biology |
| Edition | 11 |
| Author | Ury, Lisa A. Cain, Michael L. Wasseman, Steven A. Minorsky, Peter, V. Reese, Jane B. Campbell, Neil A. |
| Page Number (s) | 81 |
| Content required | Figure (s) |
| Request Information | |
| Please specify figure number (s) | 5 |
| Requester's Publisher information | |
| Additional Comments | I am writing a master's dissertation, and I am asking permission to use the figure in chapter 5: Hemoglobin. |
| Format | Print Electronic/Digital |
| Password protected | No |
| Territories | Brazil |
| Languages | Portuguese |
| Organization requested on behalf of | Federal University of Santa Maria |
| Contact name | Anissa Algara Beni |
| Address | : Avenida Porfêto Evando Behr : 5952 : Santa Maria : Brazil : 97110-800 |
| Tax / VAT number | 08207049111 |
| Instructor | Dr. Tatiana Emanuelli |
| Course name / number | Master's course in Pharmacology (1005) |
| Number of students / copies | 5 |
| Adoption | Yes |
| Start Date of use | 30-08-2019 |
| End date of use | 30-09-2021 |
| Dissertation | Yes |
| Unique ID | GPGREF-0001728 |

FIGURA 2

9/16/2019

RightsLink - Your Account

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 16, 2019

This Agreement between Anissa A Beni ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

| | |
|--|--|
| License Number | 4671110171861 |
| License date | Sep 16, 2019 |
| Licensed Content Publisher | Elsevier |
| Licensed Content Publication | Seminars in Hematology |
| Licensed Content Title | Anemia in Clinical Practice—Definition and Classification: Does Hemoglobin Change With Aging? |
| Licensed Content Author | M. Domenica Cappellini,Irene Motta |
| Licensed Content Date | Oct 1, 2015 |
| Licensed Content Volume | 52 |
| Licensed Content Issue | 4 |
| Licensed Content Pages | 9 |
| Start Page | 261 |
| End Page | 269 |
| Type of Use | reuse in a thesis/dissertation |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| Format | both print and electronic |
| Are you the author of this Elsevier article? | No |
| Will you be translating? | Yes, without English rights |
| Number of translations | 1 |
| Languages | Portuguese |
| Original figure numbers | Figure 1 |
| Title of your thesis/dissertation | EFEITO DOS CAROTENOIDES DO URUCUM SOBRE A FRAGILIDADE ERITROCITÁRIA IN VITRO E EX VIVO |
| Expected completion date | Sep 2019 |
| Estimated size (number of pages) | 70 |
| Requestor Location | Anissa A Beni Avenida Perfeito Evando Behr 5992 Santa Maria, Rio Grande do Sul Brazil Attn: |
| Publisher Tax ID | GB 494 6272 12 |
| Total | 0.00 USD |
| Terms and Conditions | |

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions

<https://s100.copyright.com/MyAccount/web/jsp/viewprintablelicensefrommyorders.jsp?ref=0f85eb48-7624-4aea-9c79-f42cacc7fd6&email=>

1/4

FIGURA 3

9/21/2019

RightsLink Printable License

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Sep 21, 2019

This Agreement between Anissa A Beni ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

| | |
|---------------------------------------|--|
| License Number | 4673841171891 |
| License date | Sep 21, 2019 |
| Licensed Content Publisher | John Wiley and Sons |
| Licensed Content Publication | Wiley Books |
| Licensed Content Title | Protective Effects of Carotenoids in Cardiovascular Disease and Diabetes |
| Licensed Content Author | Miguel Roehrs, Paula Rossini Augusti, Tatiana Emanuelli |
| Licensed Content Date | Oct 16, 2017 |
| Licensed Content Pages | 36 |
| Type of use | Dissertation/Thesis |
| Requestor type | University/Academic |
| Format | Print and electronic |
| Portion | Figure/table |
| Number of figures/tables | 1 |
| Original Wiley figure/table number(s) | Figure 16.1 |
| Will you be translating? | Yes, without English rights |
| Number of languages | 1 |
| Languages | Portuguese |
| Title of your thesis / dissertation | EFEITO DOS CAROTENOIDEOS DO URUCUM SOBRE A FRAGILIDADE ERITROCITÁRIA IN VITRO E EX VIVO |
| Expected completion date | Sep 2019 |
| Expected size (number of pages) | 70 |
| Requestor Location | Anissa A Beni Avenida Perfeito Evando Behr 5992 Santa Maria, Rio Grande do Sul Brazil Attn: |
| Publisher Tax ID | EU826007151 |
| Total | 0.00 USD |
| Terms and Conditions | |

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work

<https://s100.copyright.com/CustomAdmin/PLF.jsp?ref=a6d6d1de-1f24-4611-8a3c-cfda274ade3c>

1/5

FIGURA 4

9/17/2019

RightsLink Printable License

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Sep 17, 2019

This Agreement between Anissa A Beni ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

| | |
|--|--|
| License Number | 4671141324818 |
| License date | Sep 17, 2019 |
| Licensed Content Publisher | Elsevier |
| Licensed Content Publication | Journal of Advanced Research |
| Licensed Content Title | Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications – A review |
| Licensed Content Author | Shahid-ul-Islam,Luqman J. Rather,Faqeer Mohammad |
| Licensed Content Date | May 1, 2016 |
| Licensed Content Volume | 7 |
| Licensed Content Issue | 3 |
| Licensed Content Pages | 16 |
| Start Page | 499 |
| End Page | 514 |
| Type of Use | reuse in a thesis/dissertation |
| Intended publisher of new work | other |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| Format | both print and electronic |
| Are you the author of this Elsevier article? | No |
| Will you be translating? | Yes, without English rights |
| Number of languages | 1 |
| Languages | Portuguese |
| Original figure numbers | Figure 1 |
| Title of your thesis/dissertation | EFEITO DOS CAROTENOIDEOS DO URUCUM SOBRE A FRAGILIDADE ERITROCITÁRIA IN VITRO E EX VIVO |
| Expected completion date | Sep 2019 |
| Estimated size (number of pages) | 70 |
| Requestor Location | Anissa A Beni Avenida Perfeito Evando Behr 5992 Santa Maria, Rio Grande do Sul Brazil Attn: |

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>

1/6