

BIOESTERIFICAÇÃO DA BIXINA USANDO A ENZIMA PAPAÍNA NA PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS E SUA UTILIZAÇÃO EM DOENÇAS DEGENERATIVAS

Iêsa Matos Lima¹
Aluísio Marques Da Fonseca²

RESUMO

O aumento da expectativa de vida da população mundial tem impulsionado o crescimento do mercado farmacêutico. Uma vez que muitas doenças estão associadas ao envelhecimento como o câncer e doenças degenerativas. A biocatálise é um ramo da biotecnologia que visa à transformação química de um composto por uso de enzimas de especificidade conhecida. Sendo assim, a enzima papaína é uma mistura complexa de enzimas proteolíticas e peroxidases existentes no látex do mamoeiro (*Carica papaya*) que possui propriedades específicas para realizar hidrólise em vários substratos orgânicos. Essas reações biocatalíticas podem contribuir para o desenvolvimento de produtos de interesse na área farmacêutica e na produção de biofármacos. Neste contexto, o presente projeto tem por finalidade verificar o potencial biotecnológico da papaína em reações de bioesterificação de um produto natural conhecido como bixina, um corante extraído das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) e posteriormente realizar testes biológicos de seus bioprodutos como antioxidantes, toxicidade e acetilcolinesterase. Foi possível verificar resultados satisfatórios, condizentes com a literatura.

Palavras-chave: Biocatálise Bioesterificação Bixina Farmacologia .

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da natureza, Discente, iesamattos@gmail.com¹
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da natureza, Docente, aluisiomf@unilab.edu.br²



INTRODUÇÃO

Os biofármacos ou medicamentos biológicos, são moléculas complexas de alto peso molecular obtidas a partir de fluidos biológicos, tecidos de origem animal ou procedimentos biotecnológicos por meio de manipulação ou inserção de outro material genético (tecnologia do DNA recombinante) ou alteração dos genes que ocorre devido à irradiação, a produtos químicos ou seleção forçada (ANVISA, 2010).

O aumento da expectativa de vida da população mundial tem impulsionado o crescimento do mercado farmacêutico. Uma vez que muitas doenças estão associadas ao envelhecimento como o câncer e doenças degenerativas, sendo os biofármacos os principais medicamentos indicados para o tratamento de tais doenças (ABDI, 2017).

Pode-se citar algumas doenças tratáveis com biofármacos como: doença do Crohn, mal de Alzheimer, apnéia do sono, ataques cardíacos, câncer de mama, câncer renal, artrite reumatóide, dermatite atópica, diabetes, esclerose múltipla, fibrose cística, hemofilia, hepatite, apoplexia, insuficiência cardíaca, leucemia, leucemia linfocítica crônica, linfomas, lúpus e tumores cerebrais, dentre outras (ABDI, 2017).

Assim, a biocatálise é um ramo da biotecnologia que visa à transformação química de um composto por uso de enzimas de especificidade conhecida. Objetivando a verificação da bioesterificação de um produto natural conhecido como bixina, um corante extraído do pericarpo das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.)

A semente de urucum apresenta um pericarpo rico em bixina (metil hidrogênio 9'-cis-6,6'-diapocaroteno- 6,6'-dioato), que é um diapocarotenóide (C₂₅H₃₀O₄) com configuração cis,1,8 solúvel em solventes orgânicos e sendo o pigmento predominante nas sementes, nas preparações comerciais lipossolúveis de urucum e em colorífico (LIU et al., 2016). Os carotenóides compreendem uma família de compostos naturais, dos quais mais de 600 variantes estruturais estão relatadas e caracterizadas. Tais compostos podem ser encontrados em bactérias, algas, fungos e plantas superiores (BOADEN, 2011).

O urucum é a mais importante fonte de corante natural empregada na indústria de alimentos, correspondendo em torno de 90% do total de consumo de corantes naturais no Brasil e em torno de 70% de corantes naturais mundialmente empregados em alimentos (PEDROSA; CIRNE; M. NETO, 1999). Comercialmente a extração da bixina pode ser realizada de três formas diferentes: em meio alcalino, em óleo ou com solvente. Sendo este último o que se obtém das formas mais puras da bixina (Silva, 2007).

A necessidade crescente de novos biocatalisadores e o advento de técnicas como engenharia molecular, demandam o desenvolvimento de metodologias rápidas para revelar as atividades enzimáticas (DA GONÇALVES; MARSAIOLI, 2013). Métodos de biotransformação que utilizam enzimas em solventes orgânicos são bem conhecidos atualmente e, bastante úteis em síntese orgânica. Assim, a síntese de ésteres, lactonas, amidas, peptídeos e perácidos tem sido realizada através de procedimentos padrões (DE CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001).

METODOLOGIA

EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Comercialmente a extração da bixina (C₂₅H₃₀O₄), pode ser realizada de três formas diferentes: em meio alcalino, em óleo ou com solvente. Sendo este último o que se obtém das formas mais puras da bixina (SILVA, 2007). O método utilizado foi uma adaptação de Barbosa-Filho 1998, onde foi realizada uma extração em três fases: a primeira utilizando o extrator Soxhlet, no qual proporciona um rendimento razoável de bixina (BARBOSA; FILHO et al., 2005). O solvente entra em ebulição e o vapor alcança o condensador que fica na parte superior se tornando líquido. As gotas que resultam desta transformação caem sobre o papel filtro e



enchem o reservatório até o nível do tubo lateral que leva o solvente de volta para o balão junto com as substâncias solúveis da amostra contida no papel filtro e o ciclo é retomado até a obtenção da amostra final, o solvente usado nesta fase da extração foi o hexano (C_6H_{14}), essa extração foi repetida seis vezes no total até obtermos um quantitativo de 500g de sementes. Na segunda fase foi utilizado o solvente clorofórmio ($CHCl_3$) para uma extração a frio, sendo que a amostra permaneceu imersa no solvente por 8 horas, com posterior rotaevaporação para retirada do solvente da amostra. E na terceira fase foi realizada uma purificação, utilizando uma solução de clorofórmio/cetona na razão 1:1, com um intuito de recrystalizar as amostras, obteve-se um extrato de coloração avermelhada.

IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Para o processo de imobilização das enzimas, o procedimento foi adaptado da metodologia de Kalogeris (KALOGERIS et al., 2006). Onde foram utilizados 300,0 mL de uma solução com 30mg de enzima papaína, 3,0g de poliacrilamida (C_3H_5NO)_n, que por sua vez foi realizado sob agitação constante à temperatura ambiente por 2 horas até ser completada a miscibilidade dos materiais. Logo após a expansão das esferas de poliacrilamida, a solução será deixada em repouso à temperatura ambiente por 20 horas. Ao fim deste período, a solução contendo as esferas é submetida à filtração, e obtiveram-se então as enzimas imobilizadas. Depois da filtração, ocorreu o processo de lavagem das esferas com água destilada. Terminadas as lavagens, as esferas foram deixadas para secagem a temperatura de 32°C por dois dias, e apresentaram o aspecto esférico. Finalizado o processo, as enzimas imobilizadas foram pesadas e desidratadas.

REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO VIA ENZIMÁTICA

O substrato a ser esterificado (bixina) foi adicionado ao sistema enzimático (enzimas imobilizadas em poliacrilamida) com: Reação 1 (estereato de vinila); reação 2 (benzoato de sódio) como fontes de esterificação, em meio orgânico (hexano), de acordo com a literatura (MACHADO et al., 2008a e 2008b; FONSECA et al., 2013). A condição sugerido por (FONSECA et al., 2013), são de 6, 12, 24 esferas da enzimas imobilizadas, 50 mg do substrato (bixina), 35 mg de doador de grupo acila em 5mL de hexano, sob agitação mecânica com velocidade de 150 rotações por minuto (rpm) à temperatura de 30°C e tempo de reação de 72 horas. Conforme a figura 1, contém o esquema reacional, para ocorrência de esterificação das reações 1 e 2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

EXTRAÇÃO

Obteve-se dois materiais diferentes, sendo o primeiro proveniente da extração com o sistema Soxhlet. O principal pigmento do urucum é a bixina, correspondendo a mais de 80% dos carotenoides encontrados nessas sementes (SATYANARAYANA et al., 2003), que se denominou fração oleosa, e o segundo resultante da extração por solvente frio, que realizou-se concentrado de bixina, já que os carotenoides originados do urucum podem sofrer degradação quando expostos à luz ou submetidos a elevadas temperaturas (SATYANARAYANA et al., 2003). Após a obtenção do concentrado de bixina realizou-se um processo de purificação e recrystalização do material onde obteve-se a bixina pura.

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

As esferas de poliacrilamida tendem a aprisionar a enzimas em micro poros, ou seja, a encapsulação consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas da matriz, isso proporciona proteção e preservação da enzima encapsulada, retirando a água da solução enzimática (papaína), por meio de uma secagem em



temperatura ambiente, pois impede o contato direto com o meio reacional, minimizando, assim, os efeitos de inativação, proporcionando a imobilização da enzima.

REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO VIA ENZIMÁTICA

Métodos de biotransformação que utilizam enzimas em solventes orgânicos são bem conhecidos atualmente e, bastante úteis em síntese orgânica. Assim, a síntese de ésteres, lactonas, amidas, peptídeos e perácidos tem sido realizada através de procedimentos padrões (DE CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001). Como na reação de esterificação, onde foram adicionados na reação 1: 50 mg de bixina, 35mg de estereato de vinila (doador do grupo acila) e 5ml de hexano como meio orgânico, em três situações distintas, com 6, 12 e 24 esferas de poliacrilamida com a enzima papaína aprisionada. A reação 2 de forma semelhante foram adicionados 50 mg de bixina, 35mg de benzoato de sódio (doador do grupo acila) e 5ml de hexano como meio orgânico, também em três situações distintas, com 6, 12 e 24 esferas de poliacrilamida com a enzima papaína aprisionada. As condições para que as reações ocorressem foram em banho maria com agitação mecânica de 150 rotações por minuto (rpm), a uma temperatura de 30°C por 72 horas. Posteriormente foram retiradas as esferas contendo a enzima aprisionada. Obteve-se deste processo um concentrado de intensa coloração vermelho-púrpura e aspecto argiloso.

CONCLUSÕES

Através da metodologia utilizada para a extração da bixina, obtivemos resultados satisfatórios, os quais são coerentes com a literatura. Da mesma forma ocorreu com imobilização enzimática da papaína, obtivemos a enzima imobilizada em esferas de poliacrilamida desidratadas. Para a reação de esterificação da bixina, só foi possível realizar uma previsão do material a ser obtido, pois não foi possível verificar se realmente foi obtido ou não o produto. Devido a pandemia do SARS-CoV-2 e o isolamento, não foi possível acessar os laboratórios para assim analisar e obtermos os demais resultados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a PIBITI pelo incentivo financeiro da bolsa, a UNILAB pela disponibilização dos espaços usados, como os laboratórios, ao Grupo de Pesquisa GIQ e ao Professor Doutor Aluísio Marques da Fonseca pela excelente orientação.

REFERÊNCIAS

- ABDI. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. Biofármacos: Panorama Econômico [S.l.: s.n.] [entre 2016 e 2018].
- ALMEIDA, T. L. de. Redução de aldeídos monoterpênicos aromáticos utilizando *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em quitina. 1995, Tese (Mestrado em Química Orgânica), Universidade Federal do Ceará.
- ASSUNÇÃO, J. C. C.; MACHADO, L. L.; LEMOS, T. L. G.; CORDELL, G. A.; MONTE, F. J. Q., Sugar cane juice for the bioreduction of carbonyl compounds, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 52-53, p.194-198. (2008)
- ANVISA. RDC Nº 55: Registro de produtos biológicos. Brasil, 16 de dezembro de 2010.



- BARALDI, P. T.; CORRÊA, A. G., Baker's Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, As a Tool for the Synthesis of Pheromones, *Química Nova*, v. 27, 3, p. 421-431, 2004.
- BARBOSA-FILHO, José M. et al. TEOR DE BIXINA EM QUATRO VARIEDADES DE BIXA ORELLANA L. CULTIVADAS NA PARAIBA. [S. l.]: *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.7, 8, p. 41-47, 1998.
- BOADEN, Elizabeth Ellen. AÇÃO ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO URUCUM - BIXINA. Vinaigrette dressing sudah di gunakan lebih dari 2000 tahun yang lalu oleh bangsa mesir untuk menikmati salad mereka ini di kutip dari laman sejarah di associates dressing and sauce. Dan pada era ini vinaigrette dressing sangat terkenal di dunia bagian barat dan sering digunakan untuk salad. Salah satu bahan utama pembuatan Vinaigrette dressing adalah minyak, dan minyak yang banyak di gunakanan adalah olive oil atau minyak zaitun. Minyak zaitun berasal dari buah zaitun yang merupakan salah satu tanaman tertua di dunia. 2011. Seção July, p. 1-7.
- CARO, Y.; VILLENEUVE, P.; PINA, M.; REYNES, M.; GRAILLE, J. Lipase activity and fatty acid extracts typoselectivities hydrolysis and interesterification. *Journal of the American Oil Chemist's Society* v.77, n.4, p. 349-354, 2000.
- CORDELL, G. A.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; DE MATTOS, M. C. Vegetables as Chemical Reagents, *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 478-492, 2007.
- CRESTANI, M.; BARBIERI, R. L.; HAWERROTH, F. J.; DE CARVALHO, F. I. F.; DE OLIVEIRA, A. C., Das Américas para o Mundo - origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro, *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1473-1483, 2010.
- CUNHA, Fabiano Guimarães E. Estudo da extração mecânica de bixina das sementes de urucum em leite de jorro. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, [S. l.], p. 92, 2008.
- DA COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H., Extração de Pigmentos das Sementes de Bixa Orellana L.: Uma Alternativa para Disciplinas Experimentais de Química Orgânica, *Quim. Nova*, 28, 1, 149-152, 2005.
- DE CONTI, Roseli; RODRIGUES, José Augusto R.; MORAN, Paulo J. S. Biocatalysis: Recent advances. *Quimica Nova*, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 672-675, 2001.
- DA GONÇALVES, Caroline C. S.; MARSAIOLI, Anita J. Fatos e tendências da biocatálise. *Quimica Nova*, [S. l.], v. 36, n. 10, p. 1587-1590, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013001000016>
- ELLMAN G. L., COURTNEY K. D., ANDRES V. JR., AND FEATHERSTONE R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem.*

