BIOESTERIFICAÇÃO DA BIXINA USANDO CANDIDA ANTARCTICA LIPASE B

Ícaro Bezerra de Freitas [1], Iêsa Matos Lima [2], Francisco Lennon Barbosa da Silva [3], Antônio Luthierre Gama Cavalcante [4], Brunna Angelica Evarista da Silva [5], Aluísio Marques da Fonseca [6]

RESUMO

A biocatálise é um ramo da biotecnologia que visa a transformação química de um composto por uso de enzimas com especificidade conhecida. Através dos tempos, o homem vem desenvolvendo esses processos por meio da experimentação, sem se dar conta de sua origem e têm trazido bastantes benefícios à sociedade, como por exemplo, nos processos fermentativos na produção de alimentos ou bebidas. Já existem diversos trabalhos que utilizam compostos de origem orgânica e as enzimas como catalisadores. As fontes enzimáticas são diversas, podendo ser encontradas em microrganismos, animais, vegetais ou comerciais (enzimas isoladas). A enzima *Candida antarctica* lipase B (CALB), de origem microbiana, disponível comercialmente e com elevada atividade catalítica pode realizar reações de esterificação, com obtenção de expressivos resultados. Essas reações biocatalíticas podem contribuir para o desenvolvimento de produtos nas áreas de energias, como a produção de biocombustíveis e farmacêuticas, como nos cosméticos e fármacos. Neste contexto, o presente projeto tem por finalidade esterificar com enzima da *Candida antarctica* lipase B (CALB) um produto natural conhecido como bixina, um corante extraído do pericarpo das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) a fim de verificar suas propriedades biológicas.

Palavras-chave:

biocatálise. bioesterificação. bixina.

[1] UNILAB - Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, ICEN - Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Discente, e-mail: bezerraicaro@ymail.com
[2] UNILAB - Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, ICEN - Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Discente, e-mail: iesamattos@gmail.com
[3] UNILAB - Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, ICEN - Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Discente, e-mail: lennonsilva1717@gmail.com
[4] UNILAB - Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, ICEN - Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Discente, e-mail: luthi2011@gmail.com
[5] UNILAB - Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Mestrado em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis - IEDS, Discente, e-mail: brunna.angelica@yahoo.com.br
[6] UNILAB - Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, ICEN - Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Docente, e-mail: aluisiomf@unilab.edu.br

INTRODUÇÃO

Muitos pesquisadores nos últimos anos têm utilizado materiais vegetais como catalisadores naturais. Isso se deve ao fato de que esses biocatalisadores possuem amplo potencial biotecnológico, principalmente para aplicação no setor industrial, como agente de obtenção de drogas, cosméticos, fungicidas e possuem grande importância sintética para produção de intermediários chaves quirais de interesse farmacológico e agro químico (CORDEL et al., 2007). Os termos biocatálise ou biotransformação, de maneira geral, abrangem os processos em que um catalisador biológico é utilizado para a conversão de um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas. As biotransformações utilizando enzimas vegetais ou microrganismos vêm sido utilizadas pelo homem desde os primórdios na fabricação de pães, bebidas alcoólicas e de derivados do leite em processos fermentativos (JONG et al., 1992). Essas enzimas atuam como catalisadores específicos e quirais, pela alta versatilidade em realizar vários tipos de reações orgânicas tais como: reações de diels-alder, rearranjo de COPE, reações sigmatrópicas [3,3], rearranjo de Claisen, entre outras (FABER, 2004). As reações biocatalíticas são usualmente seguras, podendo ocorrer em condições brandas de temperatura, pH próximo de neutro, minimizando assim problemas de isomerização, racemização e epimerização de centros estereogênicos, que são frequentes quando se usam catalisadores convencionais (FABER, 2004; SILVERMAN, 2002; ALMEIDA, 1995; BARALDI et al., 2004). As enzimas possuem três tipos de seletividade: a quimiosseletividade, atuando em um único tipo de grupo funcional, preservando assim outras funções existentes na molécula; a regiosseletividade que podem distinguir grupos funcionais os quais estão quimicamente situados em diferentes regiões no mesmo substrato e a enantiosseletividade, que prevê a estereoquímica do produto final, ou seja, sua configuração absoluta, caso este composto já possua centro estereogênico, ou seja um composto com proquiralidade (FABER, 2004).

METODOLOGIA

Catalise enzimática

A metodologia utilizada para a catalise enzimática foi uma adaptação de Monteiro e colaboradores (2018), sendo feita uma reação de em banho-maria a 200 rpm, a 40°C por 8 horas, foram utilizados quatro álcoois diferentes para a tentativa de obtenção de produtos diferentes. Em cada amostra foram adicionados 50 mg de substrato (Bixina), 10 mg da enzima CALB B (Novozyne 435) e 20 µl do álcool de doação.

Rendimento a partir do Índice de Acidez (Ia)

O índice de acidez (Ia) foi utilizado com maneira de determinar se ocorreu a biocatálise e de quanto foi o rendimento, desta forma, foi realizada esta metodologia tanto com o material de partida (bixina) como com os produtos (ésteres) resultantes da biocatálise: bixalato de metanoíla, bixalato de etanoíla, bixalato de butanoíla e bixalato de propanoíla. A metodologia utilizada foi uma adaptação de Gomes (2018). Sendo feito uma neutralização do álcool comercial 70% com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 $mol.L^{-1}$. Foi realizado uma titulação simples de todos os cinco derivados, posteriormente foi realizado um cálculo do índice de acidez.

Cromatografia em camada delgada

O método utilizado é uma adaptação de Silva (2007), onde foi realizada uma extração por solvente, sendo repetidas cinco vezes com o mesmo material. O solvente utilizado foi uma mistura de clorofórmio ($CHCl_3$) e n-hexano (C_6H_{14}) na proporção de 1:1 em um volume de 700mL, onde o material com massa 576,40g, onde permaneceu imerso por volta de 48 horas na solução. Posteriormente foi realizada uma filtração simples utilizando uma peneira de aço para retirada dos grãos, e logo após uma filtração a vácuo para retirar os sólidos suspensos de onde obteve-se um sólido de coloração avermelhada. Logo em seguida, foi realizada a

extração a solução, por evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se um extrato de coloração avermelhada.

Teste de antioxidante

A bixina e seus derivados, provenientes da catálise enzimática, foram diluídos em metanol, em sete concentrações diferentes. A metodologia utilizada foi uma adaptação de Nascimento (2011). Em cada tubo de ensaio continham 2 mL de amostra, posteriormente foram adicionados 2 mL da solução de DPPH (60µM) em metanol nas amostras na ausência de luz, onde se aguardou 30 minutos para que ocorre-se o processo reacional. As amostras foram analisadas no espectrômetro de modelo T80 UV/VIS em triplicata.

Toxicidade

Para determinar a toxicidade da bixina e de seus derivados, em meio biológico, determinou-se a dose letal da mesma, a metodologia adotada para isso foi a de Ahmed (2015), com utilização dos náupilos da *Artemia salina*. Sendo registrados os valores obtidos em planilha do Microsoft Office Excel e trabalhado seus resultados estatísticos conforme registro dos dados nas 24-48 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração da bixina Obtiveram-se dois materiais na extração (o extrato e o sólido obtido da filtração a vácuo), por essa razão foi realizada uma cromatografia em camada delgada (CCD) com o padrão puro, para verificar se tratava da mesma substância. O rendimento da extração foi de 5,36%. Após a ativação da placa cromatográfica em uma chapa aquecedora a uma temperatura de 110°c por cerca de 30 minutos, foi finalizado o procedimento. Realizou-se uma pesagem de cerca de 0,1 g do extrato e posteriormente realizado uma diluição com cerca de 5 ml de clorofórmio para produção da fase estacionária, o mesmo foi feito para o sólido e a fase móvel utilizada foi a da solução de clorofórmio e metanol na proporção de 8:2. O gradiente que melhor apresentou resultados foi clorofórmio/metanol 9:1. Rendimento a partir do Índice de Acidez (Ia) Para a porcentagem do rendimento dos produtos resultantes da biocatálise foi utilizada a equação demonstrada na metodologia, assim obteve-se os seguintes resultados: bixalato de metanoíla 23,8%, bixalato de etanoíla 13,3%, bixalato de butanoíla 7,3% e bixalato de propanoíla 3,2%. Como foi possível observar, o produto que obteve o melhor rendimento foi a esterificação com metanol, o que demonstra que quanto maior a cadeia menor é o rendimento (NASCIMENTO, 2002). Atividade Antioxidante No teste de atividade antioxidante por sequestro de radical livre DPPH, foi possível visualizar que as porcentagens de antioxidante foram em média de 42,58%, e pode-se relacionar a concentração com a potencial antioxidante do composto. Para os derivados provenientes da catálise enzimática foram obtidos os seguintes resultados: bixalato de metanoíla 19,74%; bixalato de etanoíla 18,5%; bixalato de butanoíla 26,96%; e bixalato de propanoíla 19,12%. Toxicidade Após as 24 e 48 horas a porcentagem de mortalidade de larvas Artemia salina em concentrações das amostras do extrato analisando por programa de Probit. Pôde-se assim calcular a dose letal por meio da relação entre dose e mortalidade, e o cálculo da DL50 foi analisado usando regressão Probit log-dose. De acordo com Ahmed (2015), considera-se a escala da toxicidade das amostras extremamente tóxicas quando dose letal 50% (DL50) é menor a 1 ppm; altamente tóxico quando o valor DL50 entre 1 a 50 ppm; moderadamente tóxico quando o valor DL50 entre 50 a 500; ligeiramente tóxico quando o valor DL50 entre 500 a 5000 ppm; e praticamente não tóxico quando o DL50 acima de 5000 ppm. Dessa forma, para a bixina, a dose letal após as primeiras 24 horas foi de 50,208 ppm, tendo em vista que a primeira amostra foi o padrão negativo e a sexta o padrão positivo. A dose letal após 48 horas foi de 1,377 ppm, o que se pode considerar a bixina como ligeiramente tóxica. Para os produtos obteve-se os seguintes resultados: bixalato de metanoíla 3.177,4 ppm após 24 horas e 6.828,5 ppm após 48 horas, bixalato de etanoíla 3.177,4 ppm após 24 horas e 1.865,2 ppm

após 48 horas, bixalato de butanoíla 8.855,6 ppm após 24 horas e 2.2662,1 ppm após 48 horas, bixalato de propanoíla 3.712,0 ppm após 24 horas e 470,4 ppm após 48 horas.

CONCLUSÕES

Podemos destacar os derivados das reações de bioesterificacações como sendo bixalato de metanoíla, bixalato de etanoíla, bixalato de butanoíla e bixalato de propanoíla. Pôde-se observar que o rendimento da bioesterificação foi maior usando o etanol como agente acetilante com o derivado bixalato de etanoíla, pois quanto maior a cadeia do álcool utilizado menor será seu rendimento. Com relação ao potencial antioxidante da bixina e dos derivados, notou-se um decaimento no potencial dos produtos, passando de 42,58% da bixina para 26,96% do bixalato de butanoíla, sendo esse último o que alcançou o melhor potencial antioxidante dentre os produtos obtidos. A bixina é considerado ligeiramente tóxica, pois obteve-se um DL_{50} de 50,208 ppm nas primeiras 24 horas. Já nos produtos foi observada uma diminuição da toxidade, com exceção dos éster bixalato de propanoíla, que passou a ser moderadamente tóxico (470,4 ppm).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo incentivo financeiro na pesquisa, ao GIQ (Grupo Interdisciplinar em Química) pela oportunidade e parceria e a UNILAB (Universidade Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira) por disponibilizar a estrutura e os equipamentos do laboratório de química orgânica.

REFERÊNCIAS

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. 5253, p.194198. (2008).

BARALDI, P. T.; CORRÊA, A. G., Bakers Yeast, Saccharomyces cerevisiae, As a Tool for the Synthesis of Pheromones, Química Nova, v. 27, 3, p. 421-431, 2004.

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 Chemists 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.

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.