BIOESTERIFICAÇÃO DA BIXINA USANDO A ENZIMA PAPAÍNA E RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE FRENTE AOS TESTES ANTIOXIDANTES, TOXICIDADE E ACETILCOLINESTERASE

Icaro Bezerra De Freitas[1]
Aluisio Marques Da Fonseca[2]

RESUMO

Dentre as diversas áreas biotecnológicas, a aplicação de processos enzimáticos é uma das alternativas mais promissoras para a substituição de metodologias. da Bixina (metil hidrogênio 9’-cis-6,6’-diapocaroteno- 6,6’-dioato), que é um diapocarotenóide com configuração cis,1,8 solúvel em solventes orgânicos e sendo o pigmento predominante nas sementes do urucum. 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. Neste contexto, o presente projeto tem por finalidade verificar a 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. Nesse sentido foi possivel verificar que os resultados obitidos condizem com a literatura.

Palavras-chave: Bioesterificação Papaína Bixina .

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da natureza, Discente, bezerraicaro@ymail.com[1]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da natureza, Docente, aluisiomf@unilab.edu.br[2]

ISSN: 2447-6161

INTRODUÇÃO

No Brasil, diversos estudos já tratam da proibição do uso de corantes artificiais. 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 as 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

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). Países como os Estados Unidos da América do Norte, Japão e da Europa Ocidental, por lei proíbem o consumo de alimentos que contenham corantes sintéticos, por serem cancerígenos.

EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O método utilizado foi uma adaptação de (BARBOSA-FILHO et al., [s.d.]), onde foi realizada uma extração em três fases: a primeira utilizando o extrator Soxhlet, o solvente entrar em ebulição e o vapor alcança o condensador que fica na parte superior se transformando em 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 (C6H14), essa extração foi repetida seis vezes no total, até obtermos um quantitativo de 500g de sementes. Já segunda fase foi utilizado o solvente clorofórmio ($CHCl_3$) para uma extração a frio, sendo que as sementes do urucum permaneceram imersas no solvente por 8 horas, posteriormente realizou a evaporação rotativa 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 recristalizar 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 esferas de poliacrilamida (C3H5NO)n, que por sua vez estará sob agitação constante à temperatura ambiente por 2 horas até que seja completada a miscibilidade dos materiais. Após o término da expansão das esferas de poliacrilamida, a mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 20 horas. posteriormente a solução contendo as esferas é submetida à filtração, e obtiveram-se então as enzimas

ISSN: 2447-6161

imobilizadas. Após filtrações, seguiu o processo de lavagem das esferas com água destilada. Terminadas as lavagens, as esferas foram deixadas em secagem a temperatura de 32ºC por dois dias, e apresentarão o aspecto esférico. Ao fim do 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: Esquema 1 (estereato de vinila); Esquema 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 sugerida, segundo (FONSECA et al., 2013), são de 6, 12, 24 esferas de 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

EXTRAÇÃO

Obteve-se dois materiais diferentes, sendo o primeiro proveniente da extração com o sistema Soxhlet, que denominou-se de fração oleosa, e o segundo resultante da extração por solvente frio, como corante presente no urucum em maior concentração é a bixina, que compreende mais de 80% dos carotenoides totais (CUNHA, 2008), que foi denominado concentrado de bixina. Após a obtenção do concentrado de bixina realizou-se um processo de recristalização do material onde obteve-se um composto que de acordo com os parâmetros observados trata-se da bixina pura.

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

Dessa forma a enzima escolhida para este estudo foi a Papaína uma enzima proteolítica, derivada do (carica papaya), onde após a mistura de (300,0 ml de uma solução com 30mg de enzima papaína, 3,0g de esferas de poliacrilamida (C3H5NO)n) permaneceu em agitação por 2 horas, com isso as esferas de poliacrilamida tenderam a aprisionar a enzima em micro poros, isso proporcionou a proteção e preservação da enzima encapsulada, retirando a água da solução por meio de secagem ao ar livre, desta forma impediu-se o contato direto com o meio reacional, minimizando, assim, os efeitos de inativação, proporcionando a imobilização da enzimática.

REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO VIA ENZIMÁTICA

NA reação de esterificação 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. Obtivemos assim um composto de coloração avermelhada e aspecto argiloso.

CONCLUSÕES

Podemos observar que a metodologia da extração da bixina foi satisfatória pois obtivemos resultados coerentes com a literatura. O mesmo pode ser dito sobre a imobilização enzimática da papaína, onde

ISSN: 2447-6161

obtivemos a enzima imobilizada em esferas de poliacrilamida desidratadas. Na reação de esterificação da bixina, foi possível realizar uma previsão do material a ser obtido, porém não foi possível verificar se realmente foi obtido ou não, pois devido a pandemia do SARS-CoV-2 não foi possível acessar os laboratórios para assim obtermos os demais resultados. Ainda assim podemos sugerir um resultado esperado como mostrado no esquema 1 e 2, que contém o esquema reacional.

 Esquema 1: Esquema reacional da esterificação da bixina



Esquema 2: Esquema reacional da esterificação da bixina

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

ELLMAN G. L., COURTNEY K. D., ANDRES V. JR., AND FEATHERSTONE R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem.

BARBOSA-FILHO, José M.; SILVA-FILHO, Raimundo N.; LIRA, Bruno F.; MACÊDO, Rui O.; SILVA, Marcelo S.; CHAVES, Maria C. O.; SOUZA, Maria F. V.; CUNHA, Emidio V. L.; ATHAYDE-FILHO, Petrônio F. TEOR DE BIXINA EM QUATRO VARIEDADES DE BIXA ORELLANA L. CULTIVADAS NA PARAIBA. Revista Brasileira de Farmacognosia, [s.d.].

BOADEN, Elizabeth Ellen. AÇÃO ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO URUCUM - BIXINA. 2011. Seção July, p. 1–7.

CUNHA, Fabiano Guimarães E. Estudo da extração mecânica de bixina das sementes de urucum em leito de jorro. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, [S. l.], p. 92, 2008.

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. ISSN: 01004042. DOI: 10.1590/S0100-40422013001000016.

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. ISSN: 0100-4042.

LIU, S.; XU, F.; LIEW, L. N.; LI, Y. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA OBTENÇÃO DE PADRÃO DE BIXINA E DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO E SAPONIFICAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE BIXINA EM “SNACKS” EXTRUSADOS POR CLAE*. Transactions of the ASABE, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 727–736, 2016. ISSN: 21510032. DOI: 10.13031/trans.59.11366.

PEDROSA, Juarez Paz; CIRNE, Luiza Eugênea da M. R.; M. NETO, João Miguel De. Teores De Bixina E Proteína Em Sementes De Urucum Em Função Do Tipo E Do Período De Armazenagem. Revista Brasileira de

ISSN: 2447-6161

Engenharia Agrícola e Ambiental, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 121–123, 1999. ISSN: 1415-4366. DOI: 10.1590/1807-1929/agriambi.v3n1p121-123.

ISSN: 2447-6161