



UNILAB

**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA
AFRO-BRASILEIRA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA – ICEN
CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM QUÍMICA**

IÊSA MATOS LIMA

**BIOESTERIFICAÇÃO DA BIXINA USANDO A ENZIMA PAPAÍNA NA
PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS PARA FUTURA APLICAÇÃO EM DOENÇAS
DEGENERATIVAS**

REDENÇÃO

2022

IÊSA MATOS LIMA

BIOESTERIFICAÇÃO DA BIXINA USANDO A ENZIMA PAPAÍNA NA PRODUÇÃO
DE BIOFÁRMACOS PARA FUTURA APLICAÇÃO EM DOENÇAS DEGENERATIVAS

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura plena em Química do Instituto de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, como requisito parcial para obtenção do título de licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca

REDENÇÃO
2022

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Lima, Iêsa Matos.

L732b

Bioesterificação da bixina usando a enzima papaína na produção de biofármacos para futura aplicação em doenças degenerativas / Iêsa Matos Lima. - Redenção, 2022.

52f: il.

Monografia - Curso de Química, Instituto De Ciências Exatas E Da Natureza, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2022.

Orientador: Prof^o. Dr. Aluisio Marques da Fonseca.

1. Produção de biofármacos - Bixina. 2. Bixina. 3. Bioesterificação. 4. Papaína. I. Título

CE/UF/Dsibiuni

CDD 591.0724

UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-
BRASILEIRA

IÊSA MATOS LIMA

BIOESTERIFICAÇÃO DA BIXINA USANDO A ENZIMA PAPAÍNA NA PRODUÇÃO
DE BIOFÁRMACOS PARA FUTURA APLICAÇÃO EM DOENÇAS DEGENERATIVAS

Monografia julgada e aprovada para obtenção do título de Licenciado em Licenciatura plena em Química pela Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca (Orientador)

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

Profa. Me. Brunna Angélica Evarista da Silva

Profa. Dra. Camila Peixoto do Valle

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, que me conduziu durante essa jornada, iluminou a minha mente nos momentos difíceis, dando-me força, coragem e determinação para seguir, sempre em frente.

Agradeço à minha família, minha mãe, meus tios, minha tia, minha irmã, meu padrasto, meu avô. Em especial minha avó, Marluvia Matos, por suas palavras de motivação, seu carinho, amor incondicional e por todas as vezes que acreditou no meu potencial. Muito obrigada, por toda ajuda e auxílio!

Aos meus chegados, Adriana, Elizângela, Felipe, Gustavo, Ícaro, Ivaldo, Jamaica, Lennon, Mateus e Raisse, mas que amigos, família! Agradeço por compartilharem comigo essa jornada maluca, que foi cheia de risos, conversas, brigas, estresses, amizade, apoio, tristezas e imensas alegrias, os altos e baixos que nos motivam a crescer. Saibam que acredito no potencial e capacidade de cada um de vocês. Todas as pessoas chegam às nossas vidas por qualquer razão, seja apenas durante um certo tempo, ou seja, para toda vida. Brilhem!

Aos professores, em especial meu orientador, Prof. Aluísio Marques da Fonseca, que me auxiliou contribuindo com o desenvolvimento do trabalho e ajudando-me a concretizar essa ideia. Todos os integrantes do grupo de pesquisa Interdisciplinar em Química (GIQ), por todas as conversas, risadas, apoio e experiências vivenciadas durante os anos de pesquisa, os quais pude aprender e colaborar.

Gratidão ao PIBITI/CNPq por me proporcionar anos como bolsista e pesquisas, á UNILAB que me proporcionou não só minha formação acadêmica e profissional, mas contribui bastante para minha auto formação pessoal. E, por fim, a todos aqueles que diretamente ou indiretamente fizeram parte dessa jornada, ao longo dos anos do curso.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King
(1929-1968)

RESUMO

Visando o aumento da expectativa de vida da população mundial e que muitas doenças estão associadas ao envelhecimento, como o Alzheimer e outras doenças degenerativas, os biofármacos são os principais medicamentos indicados para o tratamento de tais doenças. Devido à crescente demanda por processos verdes e sustentáveis, a biocatálise enzimática vêm se apresentando como uma opção interessante em processos de produção de biofármacos, por exigirem condições mais suaves de reação. Diante desse contexto, esse trabalho teve como principal objetivo verificar as interações entre a bixina e a enzima papaína nas reações de bioesterificação da bixina, com análise por meio do docking molecular. A pesquisa foi estruturada por meio de uma metodologia científica, com base em métodos experimentais a partir de técnicas de coleta, extração, análise em docking molecular e amostragem, usando à temática de interpretação da fundamentação teórica. Os resultados demonstraram que os produtos obtidos da bioesterifuição e análise do docking, tem um potencial para utilização futura em meios ativos em doenças degenerativas como Alzheimer e Parkinson.

Palavras-chave: Bixina; Bioesterificação; Biofármacos; Papaína.

ABSTRACT

Aiming at increasing the life expectancy of the world population and that many diseases are associated with aging, such as Alzheimer's and other degenerative diseases, biopharmaceuticals are the main drugs indicated for the treatment of such diseases. Due to the growing demand for green and sustainable processes, enzymatic biocatalysis has been presented as an interesting option in biopharmaceutical production processes, as they require milder reaction conditions. Given this context, the main objective of this work was to verify the interactions between bixin and the enzyme papain in the bioesterification reactions of bixin, with analysis through molecular docking. The research was structured through a scientific methodology, based on experimental methods from techniques of collection, extraction, analysis in molecular docking and sampling, using the theme of interpretation of the theoretical foundation. The results showed that the products obtained from bioesterification and docking analysis have a potential for future use in active media in degenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's.

Keywords: Bixin; Bioesterification; Biopharmaceuticals; Papain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sementes de urucum (<i>Bixa orellana L.</i>).....	16
Figura 2 - (a) Estrutura da bixina e (b) Norbixina.....	17
Figura 3 - Configuração maioritária (diterpeno geranilgeraniol).....	18
Figura 4 - Rota de biosintética da bixina.....	19
Figura 5 - Molécula de papaína.....	21
Figura 6 - Reação de interação entre a enzima e o substrato.....	22
Figura 7 - Reação de esterificação do ácido carboxílico.....	24
Figura 8 - Mecanismo da reação de esterificação catalisadas por ácidos Brønsted.....	25
Figura 9 - Região do Maciço de Baturité.....	32
Figura 10 - Exsicata da planta <i>Bixa orellana L.</i>	33
Figura 11 - Extração Soxhlet.....	34
Figura 12 - Processo de retirada do solvente por rotaevaporador.....	34
Figura 13 - As esferas das poliacrilamidas incorporadas.....	36
Figura 14 - As esferas incorporadas e secas.....	36
Figura 15 - Estrutura do Estereato de Vinila.....	36
Figura 16 - Estrutura do Benzoato de Sódio.....	37
Figura 17 - Meio reacional da esterificação.....	37
Figura 18 - Esquema reacional de esterificação enzimática das reações 1.....	38
Figura 19 - Esquema reacional de esterificação enzimática das reações 2.....	38
Figura 20 - (a) Estrutura de ligante obtida no PubChem com seu código de registro; (b) Ligante nativo C48.....	40
Figura 21 - Reação de bioesterificação 1.....	43
Figura 22 - Reação de bioesterificação 2.....	44
Figura 23 - Interação da bixina com a papaína.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ligantes com nome da IUPAC.....	40
Tabela 2 - Resultado da simulação da bixina e o do ligante nativo C48.....	45

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1. Bixina e suas aplicações.....	16
3.2. Enzima papaína.....	20
3.3. Biocatálise e imobilização enzimática.....	22
3.4. Bioesterificação via enzimática.....	24
3.5. Biofármacos.....	26
3.6. Doenças degenerativas.....	28
3.7. Docking molecular.....	29
4. METODOLOGIA.....	32
4.1. Identificação Botânica.....	32
4.2. Coleta e tratamento inicial do material.....	33
4.3. Extração do material vegetal.....	33
4.4. Imobilização enzimática.....	35
4.5. Reação de bioesterificação via enzimática.....	36
4.6. Determinação do rendimento.....	38
4.6.1. Índice de Acidez.....	38
4.7. Estudo <i>in silico</i>	39
4.7.1. Metodologia.....	39
4.7.2. Obtenção, preparação e detecção da zona de acoplamento da enzima.....	39
4.7.3. Obtenção e preparação dos ligantes.....	39
4.7.4. Docking molecular.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1. Extração da bixina.....	42
5.2. Imobilização da enzima.....	43
5.3. Reação de bioesterificação via enzimática.....	43
5.4. Docking molecular.....	44
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
7. REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

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 (FLORES, 2019).

Os biofármacos, também conhecidos como medicamentos biológicos, são moléculas complexas de alto peso molecular obtidas a partir de fluidos biológicos, tecidos de origem animal e vegetal 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 (PRIVATO; MARTINEZ; SCHMIDT, 2020).

Algumas doenças tratáveis com biofármacos, são elas a doença do Crohn, mal de Alzheimer, apnéia do sono, ataques cardíacos, câncer de mama, câncer renal, artrite reumatóide, dermatite atópica, diabete, esclerose múltipla, fibrose cística, hemofilia, hepatite, apoplexia, insuficiência cardíaca, Parkinson, leucemia, leucemia linfocítica crônica, linfomas, lúpus e tumores cerebrais, dentre outras (FLORES, 2019).

Um processo bastante importante para a produção dos biofármacos é a biocatálise. Ela é um ramo da biotecnologia que visa à transformação química de um composto por uso de enzimas de especificidade conhecida. A utilidade da biocatálise no desenvolvimento de novas drogas e agrotóxicos é bem reconhecida e, uma variedade de enzimas já são comumente utilizadas em processos industriais. Como exemplo podemos citar os processos de síntese dos fármacos (DE CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001).

Deste modo, para as reações de bioesterificação são necessários um substrato e uma enzima como biocatalisadores. Os biocatalisadores reduzem em 30% a dispersão tóxica, o consumo de água e a intensidade do material químico residual. As reações catalisadas por enzimas, fornecem alta eficiência e seletividade em condições brandas de reação (RAVELO *et al.*, 2015).

As enzimas são proteínas que tem a função de diminuir a energia de ativação ao mesmo tempo em que aumenta a velocidade dessa reação, sem que o produto final seja alterado ou que ela seja consumida, mantendo assim o equilíbrio químico de reações bioquímicas, o que facilita para que ela trabalhe por várias vezes seguidas (MOTTA, 2011). Estão onipresentes em plantas, animais e microrganismos, onde catalisam processos vitais para os organismos vivos.

Devido à crescente demanda por processos verdes e sustentáveis, as enzimas vêm se apresentando como uma opção interessante em processos industriais por exigirem condições mais suaves de reação (temperaturas próximas a ambiente, pressão atmosférica e pH fisiológico). Além disso, o uso dessas enzimas gera menos resíduos devido ao alto grau de especificidade, fato este relacionado à sua complexa conformação tridimensional.

Posto isto, a enzima papaína obtida das cascas do mamão verde (*Carica papaya*), é uma mistura complexa de proteínas proteolíticas e de peroxidase, que possuem propriedades específicas de realizar hidrólise em vários substratos orgânicos como peptídeos, amidas, ésteres e tioésteres. Possuem uma cadeia de polipeptídeos com 212 aminoácidos (PEREIRA, 2015). Seu uso beneficia assim os objetivos de bioesterificação no trabalho.

A bixina (metil hidrogênio 9'-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato) (Figura 2), utilizada como substrato é o pericarpo presente na semente do urucum (*Bixa orellana L.*), que é um diapocarotenóide (C₂₅H₃₀O₄) com configuração cis, bastante solúvel em solventes orgânicos, além de ser colorífico está presente nas preparações comerciais lipossolúveis de urucum. Já as fontes enzimáticas são diversas, podendo ser encontradas em microrganismos, animais, vegetais ou comerciais (enzimas isoladas) (CASTRO *et al.*, 2004).

Os substratos são moléculas que se ligam à enzima e sofrem modificação por esta. Cada enzima possui um local onde ocorre a reação, denominado sítio ativo, a qual é muito específico ao substrato, que se encaixa perfeitamente a ele. Fatores como temperatura e pH podem alterar a conformação estrutural do sítio sobre a forma de interação para a formação desse complexo foram criadas, sendo o “ajuste induzido” a mais aceita (FORGIARINI; ULSON DE SOUZA; ULSON DE SOUZA, 2006). Esta teoria consiste na crença de que tanto o sítio ativo quanto a enzima sofrem pequenas alterações estruturais dinâmicas que facilitam a ligação entre ambos (ARANTES, 2008).

Conforme as pesquisas tornam-se cada vez mais intensiva em dados, os projetos e análises necessitam de ferramentas de informática. Como por exemplo as triagens de compostos, determinação do alvo de proteína. Assim a importância de ferramentas que podem melhorar e facilitar o encaixe molecular e mineração de banco de dados, como, o docking molecular e dinâmica molecular (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003).

O docking molecular, permitir analisar e visualizar o comportamento de uma substância para com a outra, informando se ambas são capazes de interagir/reagir e como essas interações ocorrem entre elas, é uma técnica de extrema importância nos estudos da Bioinformática e no planejamento racional de novos biofármacos (LIMA; MARINHO, 2017).

Sendo assim, este trabalho foi estruturado por meio de uma metodologia científica, com base em uma pesquisa realizada como método experimental, técnicas de coleta e amostragem, usando à temática de interpretação da fundamentação teórica, desde a identificação botânica do substrato e enzima até a finalização do mesmo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Verificar as interações entre a bixina e a enzima papaína nas reações de bioesterificação da bixina, com análise por meio do docking molecular.

2.2. Objetivos específicos

- Extrair das sementes de urucum (*Bixa orellana L.*) o produto natural bixina;
- Determinar o processo de bioesterificação via rota química;
- Realizar docking do ligante bixina com a enzima papaína;
- Analisar as reações com a enzima papaína imobilizada com a bixina frente a alguns ésteres como estereato de vinila e sais de benzoato de sódio.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Bixina e suas aplicações

A bixina é um carotenóide derivado de uma mistura de pigmentos de coloração que varia de amarelo a vermelho-alaranjado, extraído do pericarpo das sementes de urucum (*Bixa orellana L.*). Uma planta lenhosa e arbustiva da família Bixaceae (Figura 1.), nativa e bastante cultivada na América Latina, sendo também o principal produtor mundial de urucum, apresentando uma produção anual de aproximadamente 17 mil toneladas, das quais 12 mil são originárias do Brasil (NETO, 2018).

Figura 1 - Sementes de urucum (*Bixa orellana L.*).



Fonte: (Autor, 2022)

Ela também é conhecida pelo seu potencial anti-inflamatório e antioxidante nas reações orgânicas. Esse composto corresponde, em média, a 2,5% do peso das sementes desidratadas e trata-se de um apocarotenoide, composto originado pela clivagem de carotenoides, sendo essa ruptura mediada por enzimas que atuam em pontos específicos originando dois novos carotenóides (GARCIA, 2012).

Os carotenóides, são definidos como uma família de compostos naturais, possuidores de pigmento lipossolúveis de coloração que varia desde o vermelho até o amarelo, possuem mais de 600 variantes estruturais de notável caracterização, podendo ser encontrados em bactérias, algas, fungos e plantas superiores.

Às funções como antioxidante dos carotenóides estão relacionadas a sua estrutura química, normalmente essas estruturas possuem uma longa cadeia com diversas ligações duplas

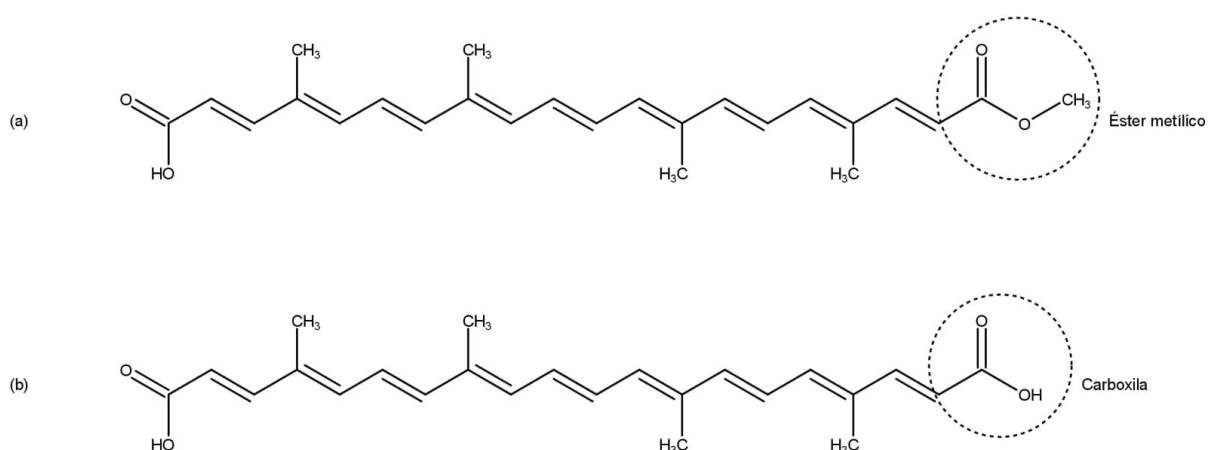
conjugadas que são responsáveis por sua cor e por algumas de suas funções biológicas, com as variações estruturais ocorrendo nas extremidades da cadeia (VIEIRA, 2015).

No Brasil, existe uma gama de variedades de fontes de carotenóides, que são encontrados em frutas e verduras. Na culinária, um dos seus reconhecidos usos é como corantes natural, o exemplo mais utilizado como tempero é o colorau – produto obtido da junção da mandioca com urucum em pó ou extrato oleoso de urucum, adicionado ou não de sal e de óleos comestíveis.

Estas plantas, no entanto, apresentam amplas variações na cor, forma e tamanho dos frutos, na produtividade de sementes, no teor de bixina e na tolerância às pragas e doenças. Estas variações são atribuídas à predominância de polinização cruzada entre indivíduos, aos genótipos e às condições de cultivo (MANTOVANI *et al.*, 2010).

Posto isso, considera-se que a bixina é um carotenóide de maior concentração nas soluções coloríficas lipossolúveis do urucum, enquanto outras derivações como a norbixina é predominante nas preparações hidrossolúveis (RIOS, A. DE O.; MERCADANTE, 2008). As diferenças estruturais entre a bixina e a norbixina (9-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato), está presente na formação do éster metílico na molécula, enquanto a norbixina apresenta maior hidrossolubilidade em razão da presença do grupamento carboxila (Figura 2), sítio de interações com moléculas de água (LIMA *et al.*, 2001).

Figura 2 - (a) Estrutura da bixina e (b) Norbixina.



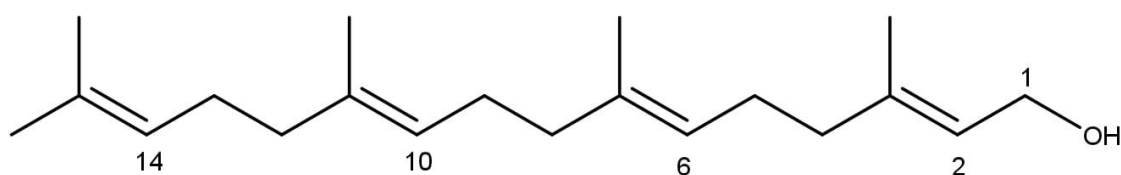
Fonte: (Autor, 2022)

A bixina possui uma cadeia isoprênica de 24 carbonos, contendo um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades, perfazendo assim a fórmula molecular $C_{25}H_{30}O_4$. Representa 80% dos pigmentos da (*Bixa orellana L.*) (COSTA, CHARLLYTON LUIS S. DA;

CHAVES, 2005). Já a norbixina ($C_{24}H_{28}O_4$) é o derivado desmetilado da bixina que, apesar de ocorrer naturalmente, é quase sempre referida como produto da saponificação da bixina, sendo está a sua forma de obtenção para fins comerciais ocorrendo apenas nesta espécie e em *Aristolochia cymbifera* Mart. A bixina ocorre de forma natural na forma 16-Z (cis), mas durante a extração esta configuração isomeriza resultando na forma 16-E (trans), que é chamada de isobixina (VILAR *et al.*, 2014).

Através de pesquisas e análise fitoquímica das sementes de urucum, outras substâncias foram relatadas, sendo os principais esteróis, compostos alifáticos e terpenos (SHAHID-UL-ISLAM; RATHER; MOHAMMAD, 2016), estando presente de forma marjoritária o diterpeno geranilgeraniol (Figura 3) (COSTA, CHARLLYTON LUIS S. DA; CHAVES, 2005).

Figura 3 - Configuração maioritária (diterpeno geranilgeraniol).



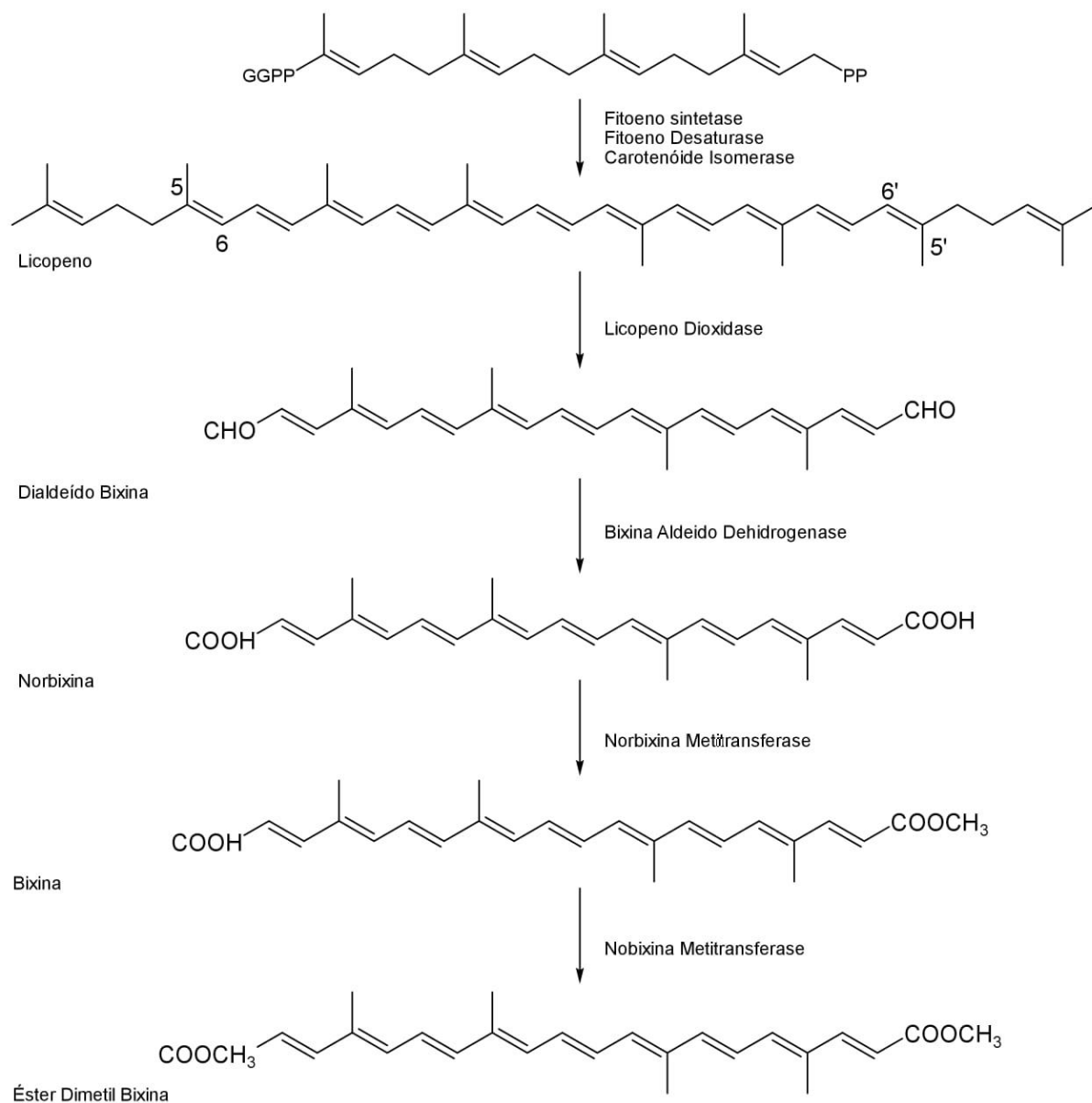
Geranylgeraniol

Fonte: (Autor, 2022)

O geranylgeraniol é encontrado em maior quantidade no óleo essencial das sementes do urucum, estando em grandes quantidades (COSTA, CHARLLYTON LUIS S. DA; CHAVES, 2005). Este diterpeno é um componente de grande importância, visto que, apresenta atividades farmacológicas como a anti-inflamatória e inibição das prostaglandinas (CASTILHO *et al.*, 2008).

Os vários compostos bioativos do urucum são provenientes do metabolismo secundário das plantas. É sugerido que a rota biosintética (Figura 4) da bixina se inicia com a quebra do licopeno e envolve a enzima carotenóide oxigenase, que cliva o licopeno nas duplas ligações 5-6 e 5'-6', seguida de um aldeído oxidase e uma metiltransferase (RIVERA-MADRID *et al.*, 2006).

Figura 4 - Rota de biosintética da bixina.



Fonte: (GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003)

Vale ressaltar, que a biosíntese da bixina além de remodelagem do licopeno, é um intermediário comum que é precursor do beta-caroteno, provitamina A (BOUVIER; DOGBO; CAMARA, 2003). Neste contexto e tendo em mente que as sementes e os extratos processados são comercializados com base no teor de bixina ou norbixina, além de fácil obtenção, a pesquisa prioriza o uso das sementes pelo caráter sustentável na aplicação biotecnológica, com ênfase na bioesterificação.

Os carotenoides presentes no urucum, como a bixina e a norbixina, em estudos sobre tratamentos diversos e doenças, foi relatado pela literatura que, após testes com cães, ratos e

coelhos, comprovou-se a eficiência da água do urucum obtida por maceração das sementes (composto por mais de 80% de bixina como pigmento), na redução significativa dos índices de colesterol (LIMA, 2001).

A bixina tem demonstrado ser um potente inibidor da peroxidação lipídica. Em estudo realizado com o intuito de testar o efeito da quercetina, bixina e norbixina no metabolismo lipídico de coelhos, resultados importantes foram obtidos com relação à importância destes dois carotenoides na prevenção e no tratamento de doenças cardíacas. Em relação aos dois carotenoides citados, a bixina apresentou o melhor efeito sobre a redução do colesterol e a manutenção dos níveis de colesterol-HDL mais elevados (CAROLINA *et al.*, 2011).

3.2. Enzima papaína

As enzimas são um grupo de substâncias orgânicas de natureza normalmente protéica (existem também enzimas constituídas de RNA 1, as ribozimas), com atividade intra ou extracelular que têm funções biocatalisadoras, capazes de catalisar reações químicas que, sem a sua presença, dificilmente aconteceriam (ZANOTTO, 2003). Acredita que isso é adquirido através da diminuição da energia de ativação necessária para que se dê uma reação química, resultando no aumento da velocidade da reação e possibilitando o metabolismo dos seres vivos (PONCIANO, 2010). A capacidade biocatalítica das enzimas torna-as adequadas para aplicações industriais, como na indústria farmacêutica ou na alimentícia.

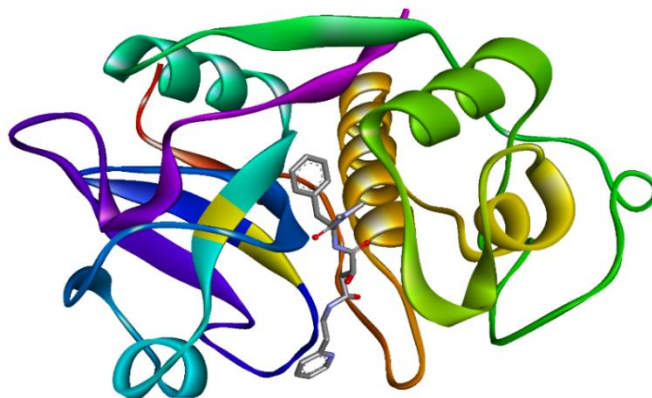
No entanto, as enzimas podem ser constitutivas ou indutivas. As constitutivas são sintetizadas de forma independente ao ambiente celular e estão presentes em quantidades constantes nas células, independente do estado metabólico do organismo (COYADO, 2016). Já as enzimas indutivas são biocatalisadores cuja síntese é sensivelmente aumentada pela presença de um indutor no meio de cultura, como forma de resposta a esta (JÚNIO, 2014).

O mecanismo de ação para acelerar as reações químicas depende da enzima. Algumas atuam reunindo dois substratos para a formação do produto, outras favorecem as condições do sítio ativo para a reação (por exemplo, alterando a polaridade, pH). O complexo enzima-substrato diminui a energia de ativação da reação alterando a estrutura espacial das moléculas do substrato de maneira a facilitar a quebra da ligação química, ajudando a alcançar o estado de transição com menor energia de ativação (ARANTES, 2008).

Considerando que, a papaína (Figura 5) é uma enzima proteolítica e alcaloídica, extraída do látex do mamão verde (*Carica papaya* L.), fruto do mamoeiro, com massa molecular 23,406g/mol, possui uma cadeia de polipeptídeos de 212 aminoácidos, em alguns casos este alcalóides são de extrema importância principalmente se consumidos em pouca quantidade

(PEREIRA, 2015). É um tipo de enzima conhecida por auxiliar no processo de digestão, a qual tem ação antioxidante e cicatrizante. A quantidade de papaína presente no mamão depende de sua espécie e ainda pode ser encontrada nas folhas e caule do mamoeiro além da semente do fruto.

Figura 5 - Molécula de papaína.



Fonte: (<https://www.rcsb.org/structure/1cvz>)

A papaína é um polipeptídeo de cadeia única com três pontes dissulfeto e um grupo sulfidrilamente essenciais para a atividade da enzima (PAUL *et al.*, 2013). Em contrapartida, dispõe de baixa estabilidade enzimática sob condições extremas (PINTO *et al.*, 2011).

A enzima é bastante usada em testes com imunoglobulinas, e na indústria farmacêutica, vem sendo usada associada a um curativo (esparadrapo + gaze) como um acelerador do processo de cicatrização, muito utilizado em tratamentos de úlceras de decúbito, sendo a principal aplicação da papaína na medicina é como agente de desfibrimento de tecido necrosado, principalmente por possuir um caráter indutivo para uso em biocatálise (CAPUCHO, 2007).

Sua origem é, muito provavelmente, no noroeste da América do Sul, vertente oriental dos Andes, ou mais precisamente, a Bacia Amazônica Superior onde a diversidade genética é máxima, o que caracteriza o mamoeiro como uma planta tipicamente tropical (VILAS BOAS, 2012). O Brasil é o segundo maior produtor de mamão mundialmente e um dos principais países exportadores.

A papaína tem propriedades bactericidas, bacteriostática e anti-inflamatórias, que reduzem a inflamação no organismo, ajudando na digestão e na cicatrização de queimaduras em conjunto com as vitaminas C e E. Porém, possui substâncias não tão benéficas que podem ocasionar o aborto em caso de gravidez (OLIVEIRA, 2007).

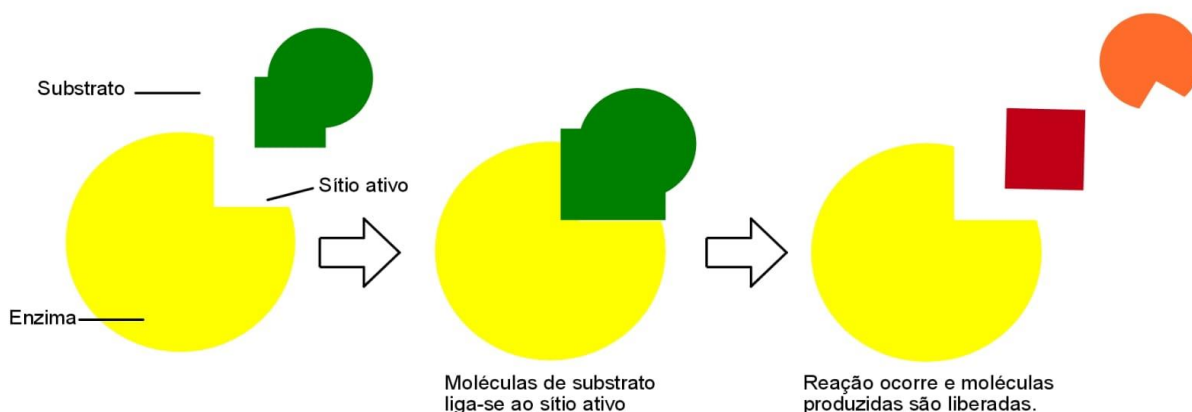
3.3. Biocatálise e imobilização enzimática

A biocatálise é uma via sustentável para a realização de reações químicas corriqueiramente realizadas em laboratórios e em grandes indústrias químicas. A catálise realizada pelos vegetais é conhecida como biocatálise ou biotransformação, de maneira geral, abrangem os processos de conversão de um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas (ALMEIDA, 2015). É perceptível a viabilidade deste procedimento em caráter industrial e o seu aperfeiçoamento quanto a diminuição no número de etapas para se obter o produto almejado.

As vantagens que a biocatálise pode levar em vários aspectos sobre a química orgânica sintética, como por exemplo, a bioconversão seletiva de cetonas insaturadas que leva à formação de cetonas saturadas, além de, apresentarem grandes vantagens tecnológicas e industriais de produção de aromáticos artificiais, comparadas com as que não se encontram capacitadas para a produção de compostos enantiomericamente puros (DE CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001).

Os processos biocatalíticos diferem dos convencionais processos químicos devido principalmente à cinética enzimática, estabilidade sob condições técnicas e características do catalisador. Sendo o último derivado de seu papel na fisiologia da célula, como crescimento, indução da atividade enzimática ou o uso de vias metabólicas para reações em várias etapas (Figura 6), assim esse processo torna-se melhor que a catalise química convencional (FREITAS, 2021). No laboratório, novas reações biocatalíticas frequentemente se originam com novas atividades enzimas (SCHMID *et al.*, 2001). Dessa forma, as reações químicas de biocatálise, por meio de rota enzimática, podem fornecer alta eficiência e seletividade em condições brandas de reação.

Figura 6 - Reação de interação entre a enzima e o substrato.



Fonte: (Autor, 2022)

A aplicação industrial de enzimas na forma livre nos múltiplos processos práticos é, muitas vezes, dificultada pela baixa estabilidade térmica, faixa estreita de pH e a perda de atividade catalítica após a finalização de um ciclo (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014). Contudo, esses inconvenientes podem, geralmente, ser superados pela imobilização enzimática (HANEFELD; CAO; MAGNER, 2013).

De acordo com a literatura, o primeiro relato de uso de enzimas com propósitos industriais foi na data de 1940, com a patente de Langlois e Dale, objetivando o emprego de amilases para a obtenção de xarope de milho. Apesar disso, as aplicações de enzimas em outros processos industriais passaram a ser dificultadas pela escassa disponibilidade e elevado custo dos biocatalisadores.

Assim, biocatalisadores de alto custo, tais como as enzimas, requerem a recuperação e a reutilização destas para tornar o processo economicamente viável, em reações de bioesterificação. Isso é alcançado com a aplicação de enzimas na forma imobilizada.

Define-se como enzima imobilizada a retenção da proteína em uma matriz, ou em um suporte sólido insolúvel, em meio aquoso e em solventes orgânicos para que seja reutilizada continuamente, criando um sistema heterogêneo (MATEO *et al.*, 2007). O reuso do biocatalisador somente é possível quando a preparação enzimática é estável o suficiente, para ocorrência da reação catalítica (SOUZA, 2017).

A imobilização também permite a utilização em operações contínuas e a separação do biocatalisador do produto, minimizando ou eliminando a transferência da proteína para etapas subsequentes do processo. Um benefício adicional é geralmente um ganho na estabilidade, sob condições de armazenamento e operacionais, a qual, geralmente, é superior em relação à enzima livre (SHELDON; VAN PELT, 2013). Outra vantagem importante da imobilização enzimática é que as enzimas imobilizadas podem ter suas propriedades biocatalíticas alteradas de maneira a permitir que preservem suas atividades em condições que não sejam ambientes aquosos (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

Existem, diferentes protocolos de imobilização que se diferenciam quanto ao tipo de suporte e eficiência. Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos, não há um método aplicável para todas as enzimas conhecidas, fazendo-se indispensável o conhecimento prévio das características do suporte e do efeito dos métodos empregados para selecionar a técnica de imobilização a ser utilizada para uma determinada finalidade (SOUZA, 2017).

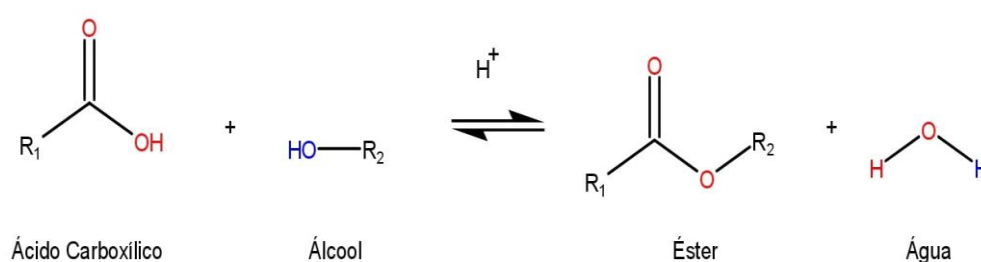
A enzima imobilizada em um suporte sólido pode atribuir diversas vantagens em relação à digestão clássica realizada em solução, como por exemplo, o aumento da estabilidade térmica, resistência à desnaturação proteica por solventes químicos e uma elevada razão enzima/substrato devido à maior área superficial, o que reduz o tempo requerido de digestão (FURLANI *et al.*, 2020).

Desse modo, a imobilização enzimática tem sido considerada, nos últimos anos, uma das técnicas mais promissoras para tornar competitiva a aplicação de enzimas em larga escala. Vale salientar que essa técnica pode ser utilizada em conjunto com os avanços da área de estabilização de proteínas alcançados pela engenharia, biologia molecular e a biologia computacional. Sendo assim, é notório que a imobilização enzimática é um procedimento amplamente usado nos laboratórios, pela confiabilidade e simplicidade da metodologia a ser baseada.

3.4. Bioesterificação via enzimática

As reações de bioesterificação são procedimentos de formação de ésteres através de ácidos graxos, o qual consiste na obtenção de ésteres a partir da reação entre um ácido graxo e um álcool de cadeia curta, exemplo metanol ou etanol, ocasionando como subproduto a água (Figura 7). A reação de esterificação pode ser catalisada por catalisadores ácidos de Brønsted ou de Lewis, por catalisadores básicos de Lewis, além de enzimas (CARDOSO, 2011).

Figura 7 - Reação de esterificação do ácido carboxílico.



Fonte: (Autor, 2022)

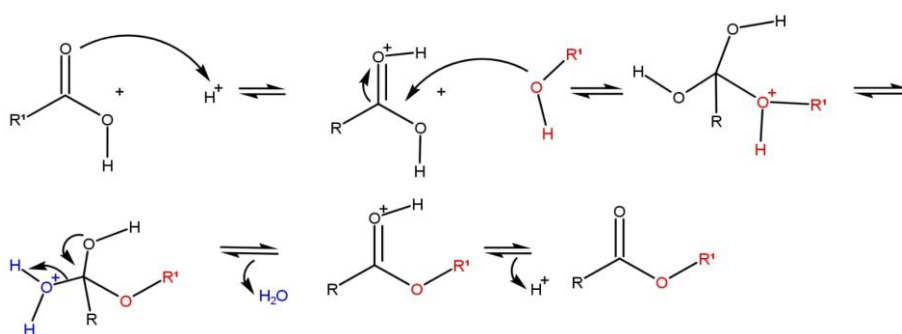
O processo para obtenção de ésteres, consiste da substituição de uma hidroxila (-OH) de um ácido por um radical alcoila (-OR), sendo que o método mais comum é a reação reversível de um ácido carboxílico com um álcool, havendo a eliminação de água e a reação de esterificação (SANTOS, 2016).

Dessa forma, a reação de bioesterificação é um processo reversível e o ácido catalisa tanto a reação direta (esterificação) como a reação inversa (hidrólise do éster). Assim, para

deslocar o equilíbrio em favor dos produtos podem-se utilizar dois métodos: remoção de um dos produtos, preferencialmente a água, ou utilizar um excesso de um dos reagentes, como o álcool (NEVES, 2008).

Nesta reação, o procedimento mais comum, é um ácido de Brønsted protonando o ácido carboxílico, o qual facilita o ataque nucleofílico do álcool na carbonila, formando assim um intermediário tetraédrico que posteriormente sofre um rearranjo, seguido da perda de uma molécula de água e formando uma molécula de éster, representado na (Figura 8) (LEÃO, 2009).

Figura 8 - Mecanismo da reação de esterificação catalisadas por ácidos Brønsted.



Fonte: (Autor, 2022)

Assim, destaca-se a importância dessas reações para o setor industrial, pois estes processos são frequentemente realizados em indústrias farmacêuticas, de cosméticos, dentre outras. O processo de esterificação é importante na produção de ésteres de interesse comercial principalmente para a produção de solventes, extractantes, diluentes, plastificantes, surfactantes, polímeros, essências e fragrâncias sintéticas, e como intermediários químicos para indústrias farmacêuticas, de herbicidas e de pesticidas (DE ALBUQUERQUE, 2010).

Em contrapartida o setor industrial enfrenta uma problemática, ao utilizarem os ácidos de Brønsted como catalisadores, pois o seu uso implica em danos ao meio ambiente. O uso desses catalisadores causa alguns inconvenientes, como a corrosão de equipamentos, o consumo do catalisador, além da utilização de grandes volumes de água na lavagem dos produtos, consequentemente gerando problemas ambientais (BOUGUERRA NEJI; TRABELSI; FRIKHA, 2009).

Deste modo as enzimas se tornaram uma das alternativas mais viáveis, inovadoras e sustentáveis para substituir o uso de catalisadores ácidos. Vale ressaltar, que a biocatálise enzimática se tornou uma das principais áreas de pesquisa em vários ramos da química e da biologia, devido apresentar um grande potencial biotecnológico no processo de otimização das reações químicas que necessitam de catalisadores para ocorrerem. Portanto, verifica-se a

importância e as vantagens do uso das enzimas nas reações químicas e biológicas. Um dos tipos de catalisadores utilizados na esterificação são enzimas, o que confere o prefixo “bio” a esterificação, dando importância que a maioria das enzimas são provenientes de organismos vivos (RAMÍREZ; AYALA, 2014).

A importância do uso de enzimas em biocatálise tem se mostrado cada vez mais evidente a grande versatilidade de reações catalisadas, em condições brandas de reação, sendo de natureza regio, quimio e enantiosseletiva algumas de suas vantagens (CARVALHO *et al.*, 2005).

Nestas condições, o processo de bioesterificação caracteriza-se por transformar um substrato em um éster, através de agentes acetilantes específicos e, conseqüentemente, um catalisador enzimático de origem vegetal, animal ou fúngica. Ressalta-se que a utilização de um biocatalisador enzimático é essencial para a caracterização deste processo.

3.5. Biofármacos

A Biotecnologia é um processo tecnológico que tem como objetivo desenvolver produtos, utilizando agentes biológicos geneticamente modificados, envolvendo a ciência e a tecnologia. Esse processo tecnológico permitiu às indústrias, a introdução de características desejáveis, como nas plantas com pouca tolerância ou resistência às secas, nas doenças com maior duração ou na eficiência, favorecendo maior valor nutricional aos alimentos, na produtividade de animais, na promoção de diagnósticos mais rápidos e precisos, na fabricação de vacinas, medicamentos ou drogas, inseticidas, na produção de produtos agrícolas, por meio das bactérias, leveduras e outros microrganismos geneticamente modificados (OLIVEIRA; SILVA, 2018).

Tendo inúmeros benefícios na indústria, uma das importantes introduções da Biotecnologia está no desenvolvimento de Biofármacos proteínas recombinantes destinadas a tratamento de doenças críticas (FERRO, EMER SUAVINHO, 2010). Uma das maiores inovações das indústrias de pesquisa e das indústrias farmacêuticas.

Os Biofármacos ou medicamentos biológicos, definidos como fármacos cujos princípios ativos são proteínas terapêuticas recombinantes obtidas por processos biológicos. No entanto, essas proteínas terapêuticas recombinantes são moléculas muito mais complexas do que as dos fármacos tradicionais sintetizados via química clássica. Elas exigem um processo de produção bastante elaborado e sofisticado e suas propriedades são altamente dependentes do processo utilizado.

Biofármacos são produzidos ou extraídos de seres vivos por meio dos processos biotecnológicos, medicamentos onde o princípio ativo é um agente biológico e são produtos obtidos por meio de micro-organismos, células inclusive animais e plantas modificadas geneticamente, capazes de sintetizar *in vivo* (REIS *et al.*, 2009). O termo “biofármaco” é aceito como parte do vocabulário farmacêutico e se refere às proteínas terapêuticas produzidas por engenharia genética ou por tecnologia de hibridomas (no caso de anticorpos monoclonais) (CASTILHO *et al.*, 2008).

Para a produção de um Biofármacos inicialmente é necessário fazer pesquisas exploratórias definindo e validando o alvo terapêutico da molécula que se liga àquele alvo, definindo a descoberta. Com o alvo validado e a proteína identificada à segunda etapa e a etapa de banco de células, para desenvolver linhagens celulares possibilitando a produção da proteína, produzindo assim um Banco de Células Mestre (Master Cell Bank), geradas por meio da seleção do clone mais produtivo (PIMENTEL *et al.*, 2013).

Os Biofármacos podem ser produzidos de várias formas, dentre eles estão: insulinas, hormônio do crescimento humano, fatores estimulantes dos granulócitos, interferões- α (IFN α), anticorpos monoclonais, vacinas, terapias celulares (FERNANDES, 2015) e proteínas recombinantes de uso terapêutico para a produção dos Biofármacos (OLIVEIRA; SILVA, 2018). Os biofármacos mais importantes na atualidade são:

- Fatores sanguíneos como o Fator VIII e IX: utilizados como fator de coagulação para a hemofilia tipos A e B.
- Agentes tromboembolíticos ativadores de plasminogênio tecidual: utilizados para condições associadas a trombose e embolias.
- Hormônios: como a insulina (utilizada para o diabetes), o hormônio do crescimento e as gonadotrofinas.
- Fatores de crescimento hematopoiéticos como a eritropoietina, que são fatores relacionados com a produção de glóbulos vermelhos utilizados no tratamento das anemias causadas por falha renal crônica ou pela quimioterapia contra o câncer.
- Interferons $-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$, que são proteínas naturais produzidas pelas células do sistema imunológico em resposta à ameaça de agentes como vírus, bactérias, parasitas e tumores. Os interferons são utilizados para tratar condições como a esclerose múltipla, leucemias e hepatite C.
- Produtos baseados em interleucinas, que são utilizados para tratar a doença de Crohn e a colite ulcerosa.

- Vacinas: para a prevenção de várias doenças.
- Anticorpos monoclonais, que são anticorpos produzidos por um tipo específico de células imunes, todos a partir de uma mesma célula (monoclonal). Os anticorpos monoclonais podem ser utilizados para tratar uma ampla variedade de doenças.
- Outros produtos: como enzimas terapêuticas e fatores de necrose tumoral, utilizados para as doenças autoimunes, como a artrite reumatoide, doença de Crohn, entre outras.

3.6. Doenças degenerativas

Doenças degenerativas são aquelas que, aliadas a um conjunto de fatores, levam à deterioração progressiva da saúde. A sua etiologia é multifatorial e sabe-se que existe uma interação entre comportamento, meio ambiente e perfil genético. É uma doença que vai gradualmente comprometendo funções vitais, como a Doença de Alzheimer e o Parkinson (FELIPE; ZIMMERMANN, 2011).

As doenças degenerativas atuam de forma evolutiva, ou seja, vão agravando o quadro do paciente ao passar do tempo, e são irreversíveis. Existem tratamentos para controlar a evolução das doenças, mas este tipo de patologia ainda não tem cura. A palavra degenerativa vem de degenerar, que em sua etimologia quer dizer perder as qualidades essenciais. Na medicina, o adjetivo degenerativo corresponde a característica de células e tecidos que vão perdendo a sua função, tornando-se essencialmente básicos e que, portanto, não controlam mais a atividade às quais deveriam ser peça-chave no funcionamento do corpo (REZENDE; SAMPAIO; ISHITANI, 2004).

Por essa razão, muitos doentes perdem a mobilidade, a memória, músculos param de trabalhar e dificultam a atividade dos órgãos internos, razões que podem levar à morte. Mas acompanhado devidamente por uma equipe médica e profissionais habilitados da área da saúde, o paciente com doença degenerativa pode desfrutar de uma vida confortável com tratamentos que retardam o desenvolvimento da doença. Para ser diagnosticado como portador de uma doença degenerativa, os sintomas não devem indicar uma inflamação, infecção ou tumor. Normalmente as doenças degenerativas são neurológicas ou osteomusculares (FELIPE; ZIMMERMANN, 2011).

Como exemplos, a diminuição dos neurotransmissores está diretamente relacionada a doença de Alzheimer (DA), sendo a causa mais comum de demência e responsável por cerca de 60-80% de todas as demências. A DA leva os pacientes a estresse emocional, distúrbios comportamentais e grande sofrimento. Atualmente, o tratamento da DA baseia-se na inibição

da AChE (acetilcolinesterase) por compostos que reduzem significativamente os sintomas da doença. Drogas sintomáticas como tacrina, donepezil, galantamina e rivastigmina são utilizadas para o tratamento, uma vez que inibem a atividade da AChE e conseqüentemente aumenta o nível da ACh (acetilcolina) (FERRO, ELLEN DAIANA SOUZA; GUIMARÃES; GONÇALVES, 2019).

A doença de Parkinson (DP) é uma afecção crônica e progressiva do sistema nervoso, caracterizada pelos sinais cardinais de rigidez, acinesia, bradicinesia, tremor e instabilidade postural. A DP é uma afecção crônica, degenerativa e progressiva do sistema nervoso central, que decorre da morte dos neurônios produtores de dopamina da substância negra, conseqüentemente acarretando diminuição das células produtoras de dopamina na via negroestriatal e dos neurônios contendo neuromelanina no tronco cerebral, especialmente na camada ventral da parte compacta da substância negra e do lócus cerúleos (SOUZA *et al.*, 2011).

Até o presente momento, não existem tratamentos para DP que prometam a reversão do quadro de degeneração neuronal. No entanto existem apenas métodos que oferecem alívio dos sintomas através de tratamentos farmacológicos, não-farmacológicos, cirúrgicos e tratamentos alternativos. O tratamento da DP é feito de acordo com os estágios da doença. Em geral, o estágio inicial é quando os sintomas são brandos, perceptíveis, mas ainda não incomodam o paciente e não há necessidade de utilizar medicamentos sintomáticos. Atualmente, existem estudos que demonstram o uso do inibidor da MAO-B, como a Selegilina e Resagilina, provocam um efeito sintomático suave, retardando a necessidade do uso da Levodopa por um intervalo médio de 9 meses. Mas ainda não se sabe o grau de eficácia desses medicamentos, pois os estudos não demonstraram benefícios como o efeito neuroprotetor (SILVA *et al.*, 2021).

3.7. Docking molecular

Conforme a pesquisa biológica torna-se cada vez mais intensiva em dados, os projetos biomédicos necessitam de ferramentas de informática. Por exemplo, na pesquisa de descoberta de drogas, muitas vezes utiliza-se a triagem de milhões de compostos para um determinado alvo de proteína. São importantes ferramentas que podem melhorar e facilitar o encaixe molecular e mineração de banco de dados, como, o docking molecular e dinâmica molecular (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003).

O Docking molecular ou ancoramento molecular é uma ferramenta chave, utilizada na busca de novas entidades moleculares que possam ser promissores candidatos a fármacos empregados em diferentes patologias (ANDRICOPULO; SALUM; ABRAHAM, 2009). É uma

técnica computacional capaz de nos permitir analisar e visualizar o comportamento de uma substância para com a outra, de forma, a saber, se ambas são capazes de interagir/reagir e como essas interações ocorrem entre elas, é uma técnica de extrema importância nos estudos da Bioinformática e no planejamento racional de novos biofármacos (LIMA; MARINHO, 2017).

O termo “docking” é usado para descrever um conjunto de algoritmos computacionais que têm por objetivo encontrar o modelo mais próximo ao nativo da interação entre duas proteínas, ou seja, o complexo encontrado na natureza. Em uma visão geral, um programa de docking recebe os arquivos de coordenadas de uma proteína receptora e uma proteína ligante, e retorna um conjunto de arquivos de coordenadas tridimensionais dos modelos mais bem ranqueados de acordo com vários critérios, que geralmente incluem complementos esteroquímicos, eletrostáticos, formação de ligações de hidrogênio e solvatação (FIOROTE, 2019).

Os resultados permitem estabelecer potenciais ligantes, buscando-se seletividade, além de possibilitar a otimização de compostos através de possíveis e permitidas modificações estruturais que elevem o nível de interações com os resíduos de aminoácidos no interior do sítio de interação (ANDRICOPULO; SALUM; ABRAHAM, 2009).

Atualmente existem duas formas de realizar o docking, através de uma pesquisa de banco de dados e geração de estrutura. Sendo a pesquisa de banco de dados, capaz de selecionar ligantes complementares a um receptor de um banco de dados de compostos pré-existentes, enquanto o outro tenta criar ligantes feitos sob medida para caber no local de interesse (GSCHWEND, DANIEL A.; GOOD, ANDREW C.; KUNTZ, 1996).

Os algoritmos gerados no docking seriam considerados ineficazes se não tivessem a capacidade de estimar a afinidade da interação entre o receptor e as conformações e orientações dos ligantes propostos. Desse modo, além de apresentar a função de busca estratégica, apresentam também a função de pontuação (scoring), a qual é responsável por prever o ΔG dos complexos propostos pela função de busca estratégica (KITCHEN et al., 2004).

A eficácia da função de busca é avaliada pelo desvio médio quadrático da raiz (RMSD) do ligante obtido do docking quando comparado ao ligante cristalográfico da estrutura utilizada, quanto menor o desvio médio quadrático (RMSD) mais similares serão as estruturas e melhor será o modelo. Para que a parametrização seja considerada satisfatória o valor do RMSD obtido deve ser menor ou igual a 2 Å (HELENA *et al.*, 2020), isso ocorre porque a maioria das estruturas cristalográficas têm resolução de 2 Å, e assim torna-se desnecessário exigir que o docking tenha uma exatidão maior que a resolução da estrutura cristalográfica (FREITAS, 2021).

Ressaltar-se que o docking molecular é um estudo in sílico, ou seja, esse processo estabelece o uso de recursos computacionais como suporte para simulações de sistemas biológicos, ou seja, ambos os participantes (alvos e fármacos) quanto os ambientes (corpo humano) são simulados. Nesse processo, destacam-se os sistemas utilizados: Protein Data Bank, AutoDockTools, AutoDockVina, PubChem, Avogadro, ChimeraX e Discovery Studio Visualizer (FREITAS, 2021).

4. METODOLOGIA

4.1. Identificação Botânica

Nos municípios de Palmácia e Redenção, cidades que fazem parte da região do Maciço do Baturité (Figura 9), que se localiza ao NNE do estado do Ceará, entre as coordenadas de Latitude S 4° 4' 30"; Longitude W 38° 52' 39.15. Foram adquiridas amostras de sementes de urucum (*Bixa orellana L.*).

Figura 9 - Região do Maciço de Baturité.



Fonte: (<http://www.sintsefceara.org.br/delegacia/macico-de-baturite>)

A exsicata da espécie (*Bixa orellana L.*), retirado da biblioteca/herbário virtual do site, refloresce. Esta exsicata foi coletada em outubro de 1995, por S.R. Ziller, no estado de Paraná, na cidade de Altônia, Floresta Estacional Semidecidual, e foi descrita como uma planta exótica, arbustiva, frutos secos e sementes vermelhas usadas para tingimento. A (Figura 10) demonstra a seguinte exsicata de código HUEM000002485.

Figura 10 - Exsicata da planta *Bixa orellana* L.



Fonte: Herbário virtual (Reflora)

4.2. Coleta e tratamento inicial do material

Primeiramente, foram realizadas as coletas das sementes nas localidades dos municípios já referidos, sendo estas recolhidas em recipientes plásticos, que por sua vez, foram levadas ao Laboratório de Química Orgânica - UNILAB. Sequencialmente, sucedeu-se a limpeza das sementes coletadas sem nenhum tratamento. As sementes foram catadas e peneiradas, reduzindo assim a quantidade de fuligem derivada da própria planta. Em seguida, deu-se início às extrações da bixina.

4.3. Extração do material vegetal

Os métodos de extração dos pigmentos presentes na semente da (*Bixa orellana* L.), seja para determinação da composição química ou averiguação de atividades sobre organismos vivos, são realizados com o uso de solventes, tais como propilenoglicol, óleo, água pura e soluções alcalinas (COSTA, CHARLLYTON LUIS S. DA; CHAVES, 2005). Contudo a extração por meio de solventes orgânicos, contém o melhor resultado para bixina pura.

A extração é realizada em três fases, de acordo com a metodologia adaptada de Barbosa-Filho (BARBOSA-FILHO, 1998), sendo a primeira utilizando o extrator Soxhlet, no qual proporciona um rendimento razoável de bixina (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2005). No extrator de Soxhlet o solvente entra em ebulição e o vapor alcança o condensador que fica na parte superior tornando-se 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, de acordo com a (Figura 11). Essa extração é necessária para a retirada dos lipídios e pigmentação das sementes de urucum (*Bixa orellana L.*).

Figura 11 - Extração Soxhlet.



Fonte: (Autor, 2019)

Para esta fase da extração, foi utilizado como solvente 150ml de hexano (C_6H_{14}) e um quantitativo de 500g de sementes no total, sendo divididas em 83,33g para o Soxhlet, para cada uma das seis extrações, por um período de 8 horas. A segunda fase da extração, é a frio, extrato permaneceu imerso em 500ml do solvente clorofórmio ($CHCl_3$) por 8 horas.

Posteriormente foi levado ao rotaevaporador para ser retirada da amostra o solvente (Figura 12). Para fornecer sucção e evaporação do solvente ainda presente na amostra e obtenção da massa suspensa de coloração vermelho-alaranjado, utilizou-se a bomba a vácuo.

Figura 12 - Processo de retirada do solvente por rotaevaporador.



Fonte: (Autor, 2019)

Na terceira e última fase, realizou-se uma purificação do extrato sólido, o resíduo sólido clorofórmio foi resolubilizado numa mistura clorofórmio/cetona na razão (1:1) de 200ml e deixado no freezer por 24 horas. No dia seguinte o precipitado foi filtrado e recristalizado em CHCl_3 . Adaptação da metodologia de extração (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2005). Assim é possível uma purificação do produto, desta forma, houve uma recristalização nas amostras, novamente foi utilizado a bomba a vácuo, em seguida foi pesado para determinação do rendimento. Obteve-se um extrato de coloração avermelhada.

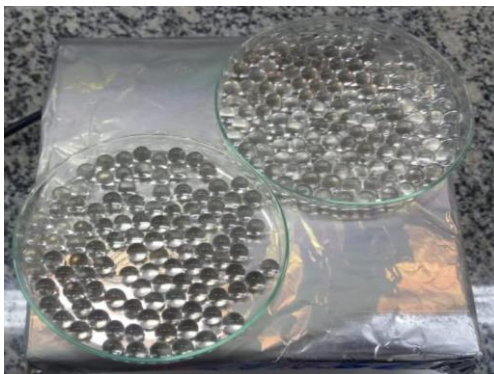
4.4. Imobilização enzimática

Nesta etapa, iniciou-se o processo de imobilização das enzimas das cascas do mamão verde, baseado e adaptado à metodologia de Kalogeris (GUZIK; HUPERT-KOCUREK; WOJCIESZYNSKA, 2014). Para tanto, em um Erlenmeyer de 500ml, foram adicionadas uma massa de 100g de cascas de mamão cortados, um volume de 400ml de água destilado, por 48 horas. Depois desse tempo, utilizou-se 300ml da solução aquosa contendo aproximadamente 30mg de enzima papaína e 3,0g de esferas de poliacrilamida ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$)_n). Após o referido procedimento, essa solução foi vedada com papel filme e submetida a agitação constante, em um agitador magnético, à temperatura ambiente por 2 horas, até ser completada a miscibilidade dos materiais.

Após a agitação da solução, a mesma foi deixada em repouso, para a expansão das esferas de poliacrilamida, em temperatura ambiente por 20 horas. Ao fim deste período, para separar a parte sólida (esferas de poliacrilamida e cascas de mamão) da parte líquida presente, utilizou-se do método de filtração e peneiração. Em seguida, para separar as esferas das cascas, fez-se uso do método de catação.

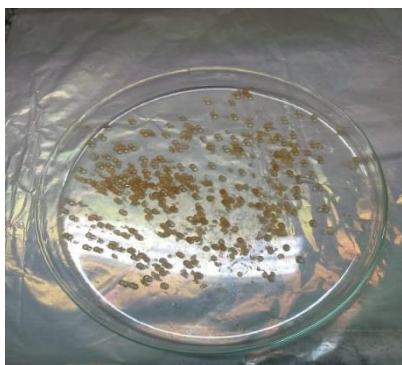
Posteriormente, as esferas foram lavadas com água destilada, para retirar alguns resíduos de cascas e logo foram colocadas em placas de petri para secagem em temperatura de 32°C por 5 dias (Figura 13). Finalizado o processo, as enzimas imobilizadas e secas nas placas de petri foram pesadas, desidratadas e vedadas com papel filme e reservada para futuras reações de bioesterificação (Figura 14).

Figura 13 - As esferas das poliacrilamidas incorporadas.



Fonte: (Autor, 2019)

Figura 14 - As esferas incorporadas e secas.

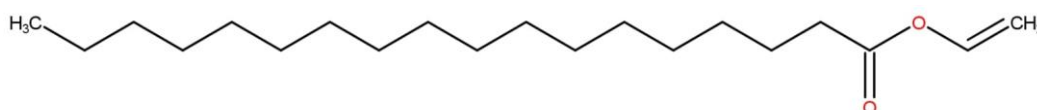


Fonte: (Autor, 2019)

4.5. Reação de bioesterificação via enzimática

O substrato a ser esterificado (bixina) foi adicionado ao sistema enzimático (enzimas imobilizadas em poliacrilamida (C_3H_5NO) $_n$) com estereato de vinila ($C_{19}H_{36}O_2$) (Figura 15), para a primeira reação e benzoato de sódio ($C_7H_5NaO_2$) (Figura 6) para a segunda reação, em meio orgânico (hexano), de acordo com a literatura (MACHADO *et al.*, 2008).

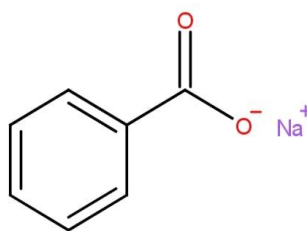
Figura 15 - Estrutura do Estereato de Vinila.



Estereato de vinila

Fonte: (Autor, 2022)

Figura 16 - Estrutura do Benzoato de Sódio.



Benzoato de Sódio

Fonte: (Autor, 2022)

Numa primeira condição, foi sugerido, de acordo com Fonseca (JESUS; NOGUEIRA; FONSECA, 2013), são de 6, 12, 24 esferas das enzimas imobilizadas, 50mg do substrato (bixina), 35mg 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 (Figura 17).

Figura 17 - Meio reacional da esterificação.

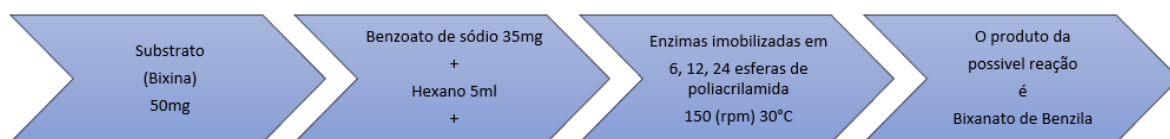


Fonte: (Autor, 2019)

De acordo com as condições coletadas pela literatura, as reações de bioesterificação foram preparadas e realizadas, seguindo o esquema reacional de esterificação enzimática (Figuras 18 e 19). Processo esse capaz de sugerir o produto, analisando o substrato, composto químico, o solvente em meio orgânico e a enzima já imobilizada.

Figura 18 - Esquema reacional de esterificação enzimática das reações 1.

Fonte: (Autor, 2020)

Figura 19 - Esquema reacional de esterificação enzimática das reações 2.

Fonte: (Autor, 2020)

4.6. Determinação do rendimento

4.6.1. Índice de Acidez

A determinação da acidez pode fornecer um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo ou determinar o rendimento de uma esterificação. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons hidrogênio. A decomposição dos glicerídeos é acelerada por aquecimento e pela luz, sendo a rancidez quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres (LUTZ, 2004).

O índice de acidez corresponde ao número de miligramas de KOH necessário para neutralizar a acidez de 1 g de uma amostra de éster (mg KOH/g), sendo essa acidez reflexo da presença de moléculas que não reagiram ainda. O índice de acidez também pode ser fornecido em termos de % de ácidos. A reação ocorrida durante a determinação é uma neutralização simples. As moléculas que possuem a funcionalização de ácidos carboxílicos reagem com a base titulante, hidróxido de sódio ou de potássio, formando sais e água (COSTA, GIRLENE; *et al.*, 2013).

Pesou-se 2,0174g do produto final em um erlenmeyer de 125 mL. Adicionou-se 25 mL de éter: álcool (2:1) neutro. Acrescentou-se 2 gotas de fenolftaleína e fez-se a titulação com NaOH 0,1 M até o aparecimento da coloração rósea, a metodologia utilizada foi adaptada por (LUTZ, 2008). O cálculo realizado pode ser observado na (Equação 1) a seguir:

$$I. A = \frac{Vg \times f \times M \times 5,61}{P_A} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde

I.A = índice de acidez/rendimento parcial.

Vg = volume gasto na titulação de hidróxido de sódio de 0,1 M ou 0,01 M.

f = fator de correção de solução NaOH em 0,1, M.

5,61 = massa referente a solução de KOH 0,1mol⁻¹.

P_A = massa da amostra em gramas.

4.7. Estudo *in silico*

4.7.1. Metodologia

Tendo em vista a necessidade de comprovação da reação, foi realizado um docking. O processo de acoplagem do ligante bixina na enzima papaína, esse processo foi realizado em três etapas distintas: obtenção e preparo do ligante e da enzima e o acoplamento com o docking molecular.

4.7.2. Obtenção, preparação e detecção da zona de acoplamento da enzima

A estrutura cristalina do código da papaína ID 1CVZ foi obtida do Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). A ferramenta computacional Discovery Studio Visualizer (BIOVIA, 2015) foi usada para remover moléculas de água e outros resíduos desnecessários e detectar as coordenadas da zona de acoplamento, ou seja limpeza e obtenção das coordenadas do sítio ativo enzimático. Para o reparo dos átomos perdidos, a adição de cargas polares e hidrogênios à estrutura tem usado o Software AutodockTools, realizando adequação da enzima e restauração dos átomos perdidos (MORRIS *et al.*, 2009).

4.7.3. Obtenção e preparação dos ligantes

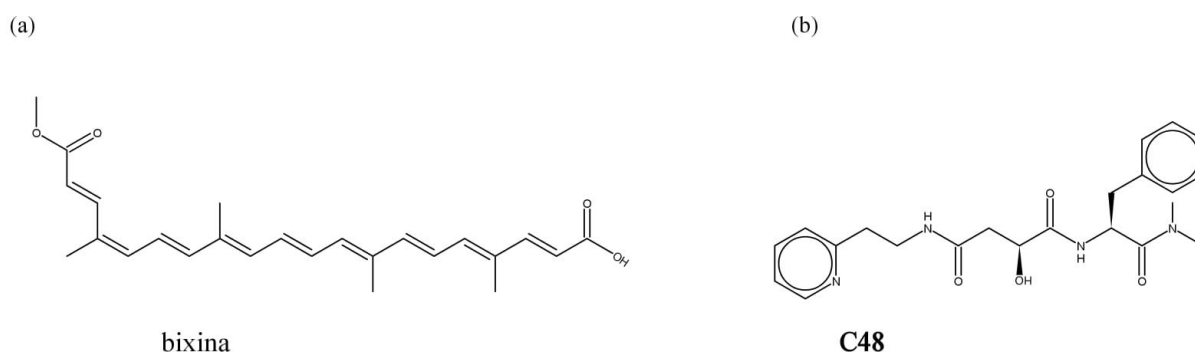
Os ligantes (Tabela 1 e Figura 20) foram obtidos pelo repositório de moléculas orgânicas PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Assim, para validar o método, foi realizada a redocking com o ligante C48 (N1-(1-DIMETHYLCARBAMOYL-2-PHENYL-ETHYL)-2-OXO-N4-(2-PYRIDIN-2-YL-ETHYL)-SUCCINAMIDE), que estava no arquivo original da proteína co-cristalizada.

Tabela 1 - Ligantes com nome da IUPAC.

Código do ligante	Nome do IUPAC
CID5281226	Bixina
C48	(N1-(1-DIMETHYLCARBAMOYL-2-PHENYL-ETHYL)-2-OXO-N4-(2-PYRIDIN-2-YL-ETHYL)-SUCCINAMIDE)

Fonte: (Autor, 2022)

Figura 20 - (a) Estrutura de ligante obtida no PubChem com seu código de registro; (b) Ligante nativo C48.



Fonte: (Autor, 2022)

4.7.4. Docking molecular

O programa Avogadro® (HANWELL *et al.*, 2012) foi utilizado para aplicar o campo de força universal, e os demais parâmetros de preparação de ligantes foram adicionados no programa AutoDock Tools (HUEY; MORRIS; FORLI, 2012), como a identificação de átomos centrais (raiz), a definição do número de torção ativa e identificação do número de ligações rotativas dinâmicas (escolha torção). Os arquivos de saída foram salvos no formato pdbqt.

Para as simulações de acoplamento molecular, o código AutoDock Vina foi usado (TROTT; OLSON, 2009). Os visualizadores Discovery Studio Visualizer e ChimeraX (PETTERSEN *et al.*, 2021) analisaram os resultados e geraram as imagens (SCHRODINGER LLC, 2015).

Assim, para validar o desempenho da simulação e quantificar a qualidade dos acoplamentos, foi adotado o critério de pontuação RMSD (desvio quadrado médio raiz), o que sugere que um acoplamento bem-sucedido exibe um valor $\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ \AA}$ (SUTHERLAND *et al.*, 2007) e, paralelamente, o uso da rede neural NNScore com a medição na concentração molar da melhor pose (DURRANT; MCCAMMON, 2010, 2011), e o critério de menor energia vinculante sugerem que, no complexo previsto pelo acoplamento molecular, a menor energia de ligação é assumida como mais próxima do estado nativo do complexo, onde pode ser associada a uma constante de afinidade (FU; ZHAO; CHEN, 2018; HAVRANEK; ISLAM, 2020).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração da bixina

Da extração de bixina das sementes de urucum coletas, obteve-se dois materiais diferentes. Contudo um dos materiais, modifica sua coloração de acordo com os métodos de recristalização.

Na extração com soxhlet, usando o hexano (C_6H_{14}) como solvente, houve formação de um produto com características oleaginosas de coloração vermelho escuro. Essa formação denomina-se fração oleosa e a pigmentação forte no tom de vermelho, corresponde mais ou menos a 80% dos carotenóides encontrados nessas sementes (SATYANARAYANA; PRABHAKARA RAO; RAO, 2003). A extração derivada do soxhlet proporciona um rendimento de aproximadamente 1,3% de bixina (BARBOSA-FILHO, 1998). A utilização do hexano como solvente orgânico, na extração, proporciona uma forma mais pura de pigmentos de bixina (TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015). O rendimento obtido para a fração oleosa, a partir dos processos realizados, foi de 16,5154g (3,3%).

Na extração a frio, o solvente utilizado foi o clorofórmio ($CHCl_3$), após a retirada do solvente da amostra líquida no rotaevaporador, obteve-se um resíduo sólido de coloração vermelho-alaranjado. Esse produto sólido de coloração avermelhado denomina-se concentrado de bixina (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2005). Após a recristalização em $CHCl_3$, o produto fornecido é a bixina pura na forma de cristais vermelho púrpura de p.f 194-195°C. O uso de clorofórmio para a recristalização, deriva da sua capacidade de separar a bixina de seus outros constituintes (BARBOSA-FILHO, 1998). Assim, o rendimento obtido após todo o processo de purificação do extrato seco, foi de 10,5875g (2,11%).

A variação de coloração da bixina, após a recristalização, baseia-se nas diferenças estruturais entre os isômeros cis e trans, ambos são responsáveis por resultar em particularidades nas características físicas. A bixina, embora solúvel em soluções de reduzida polaridade, quando presente na forma do isômero cis não apresenta extensa solubilidade em óleos vegetais em razão da polaridade provida pelos grupos situados no mesmo lado da estrutura. Por outro lado, a trans-bixina é solúvel em óleos e proporciona coloração vermelha, diferindo do isômero cis, de coloração alaranjada (SATYANARAYANA; PRABHAKARA RAO; RAO, 2003). Os carotenóides originados do urucum podem sofrer degradação quando expostos à luz ou submetidos a elevadas temperaturas.

5.2. Imobilização da enzima

As enzimas encontradas nas cascas do mamão verde, foram incorporadas a uma matriz polimérica de poli(acrilamida) $(C_3H_5NO)_n$, com a finalidade de fornecer maior estabilidade, facilitar a recuperação e reutilização desses catalisadores (JESUS; NOGUEIRA; FONSECA, 2013).

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). Dessa forma, impediu-se o contato direto com o meio reacional, minimizando, assim, os efeitos de inativação, proporcionando a imobilização enzimática.

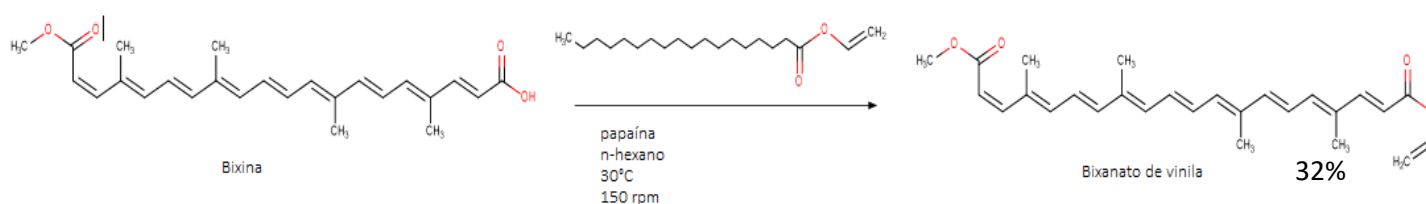
As enzimas indutivas são biocatalisadoras cuja síntese é sensivelmente aumentada pela presença de um indutor no meio de cultura, como forma de resposta a este. O substrato indutor neste caso foi a bixina. Pois, a enzima é ativa entre pH 5,0 e 9,0 e é estável até 80°C ou 90°C na presença de substratos (RAO *et al.*, 1998). Assim, a eficiência desta combinação se mostrou bastante promissora. Pois a bixina possui valores de pH menores que 11, sem sofrer aquecimento, e sem a formação de norbixina, mas somente bixina.

5.3. Reação de bioesterificação via enzimática

Métodos de bioesterificação que utilizam enzimas em solventes orgânicos são bem conhecidos atualmente e bastante úteis em síntese orgânica (DE CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001).

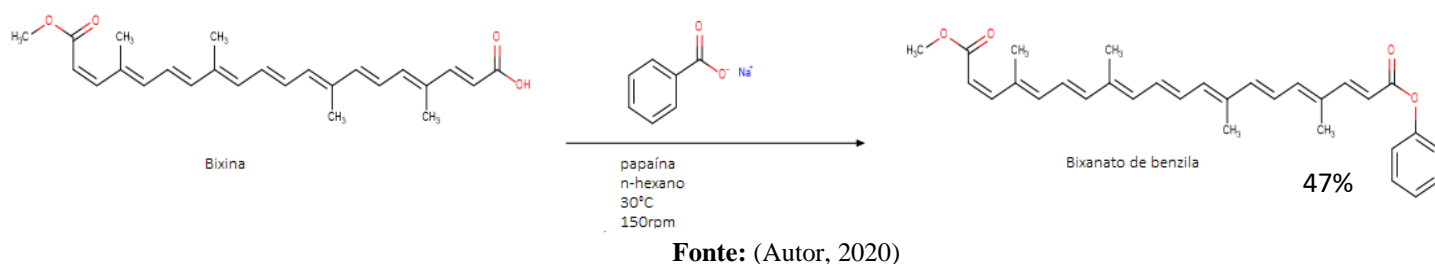
Para a ocorrência das reações de bioesterificação da bixina com a enzima já imobilizada, em meio orgânico com hexano. Foi necessário banho maria com agitação mecânica de 150 rotações por minuto (rpm), a uma temperatura de 30°C por 72 horas, para cada doador do grupo acila utilizado, Estereato de vinila ($C_{19}H_{36}O_2$) e o Benzoato de sódio ($C_7H_5NaO_2$). Na primeira reação obteve como produto o Bixanato de vinila (Figura 21) com rendimento de 32%, na segunda reação o produto foi Bixanato de benzila (Figura 22) com rendimento de 47%.

Figura 21 - Reação de bioesterificação 1.



Fonte: (Autor, 2020)

Figura 22 - Reação de bioesterificação 2.



A escolha dos doadores do grupo acila, foi referente a importância para a síntese biológica e a quebra de moléculas orgânicas. Sendo que esse grupo normalmente liga-se a uma molécula maior, de modo que os átomos de carbono e oxigênio são unidos por uma ligação dupla (MOTTA, 2011). Em contrapartida todos os compostos que recebe o grupo funcional acila, sofre acetilação ou etanoilação. Por essa razão foi pensado no estearato de vinila e o benzoato de sódio, para minimizar essas ocorrências.

Sendo que o benzoato de sódio é considerado um ativo conservador, pois não altera o valor biológico e não é corrosivo. Durante o seu uso, o sal é convertido na forma ácida que corresponde à forma ativa de inibição. A eficiência do inibidor é da ordem de 100 vezes maior em substratos ácidos que em ligantes ligeiramente alcalinos e o pH ótimo para o efeito inibitório é entre 2,5 e 4,0 (CHERUBIN, 1998). O referido inibidor também é mais eficiente em meios com baixos teores de aminoácidos (SIMÃO, 1985).

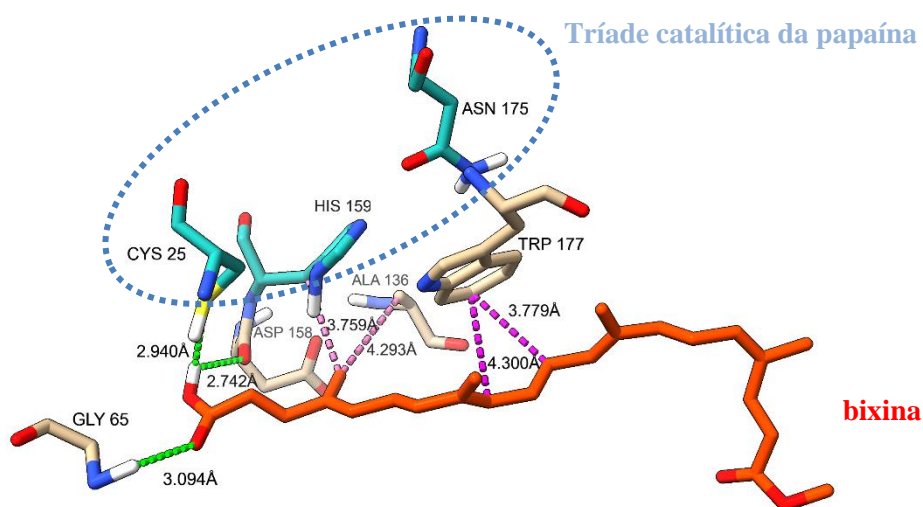
5.4. Docking molecular

A simulação da papaína com a bixina mostrou que o carotenoide interagiu na mesma região do sítio ativo, Cys25-His159-Asn175 (KLEIN *et al.*, 2018), com a porção do ácido carboxílico, o que demonstra a seletividade desta enzima com a região que sofrerá a esterificação (FABER, 2011). Sua energia de afinidade apresentou um valor de -5,5Kcal/mol, com RMSD de 1,4 Å. Bem próximo ao do ligante nativo C48 que apresentou no redocking um valor de -6,5 Kcal/mol e RMSD 2,0 Å. As principais interações da bixina foram Trp177 (pi-sigma), **His159** (faz parte da tríade, tipo alquila), Ala136 (tipo alquila), e ligações de hidrogênio com os resíduos Asp158, Gly65 e **Cys25** (faz parte da tríade). Como mostrado na (Tabela 2) e (Figura 23).

Tabela 2 - Resultado da simulação da bixina e o do ligante nativo C48.

Código do ligante	ΔG (Kcal/mol)	RMSD (Å)
CID5281226	-5,5	1,4
C48	-6,5	2,0

Fonte: (Autor, 2022)

Figura 23 - Interação da bixina com a papaína.

Fonte: (Autor, 2022)

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na extração da bixina pura, obteve-se a fração oleosa e o extrato seco, com o rendimento de 3,3% e 2,11%, respectivamente. Usando a enzima papaína como biocatalisador e doadores do grupo acila, foi possível obter os seguintes produtos, bixanato de vinila e bixanato de benzila, a partir da bixina, com os rendimentos de 32% e 47%, respectivamente.

O docking é um indicador que a reação de bioesterificação realmente ocorra, na simulação o substrato (bixina) acoplou exatamente na região da tríade catalítica da enzima (papaína). Essa interação da papaína, reagiu melhor com a bixina do que com a proteína já acoplada antes. A interação no sítio ativo foi melhor com aminoácido histidina (His159), ofereceu um valor de afinidade (RMSD) menor do que a proteína nativa, sendo 1,4 Å apresentado no redocking. Pode-se considerar que as reações realmente ocorreram, obtendo-se rendimentos bastante satisfatórios.

Tendo em mente que o bixanato de benzila proporcionou um rendimento maior que o outro produto, de 47%, a fração oleosa teve um rendimento maior que o extrato seco, e que a interação da papaína com a bixina através do docking molecular foi bastante significativa, em razão ao estudo de biofármacos. Em uma perspectiva futura os produtos obtidos por meio dessa pesquisa, poderão ser utilizados em outros meios ativos, para doenças degenerativas como o Alzheimer, Parkinson.

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Florença Etossi Benoliel. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS ENZIMAS ENCONTRADAS NOS VEGETAIS DA FLORA PRESENTE NO MACIÇO DE BATURITÉ-CE. *UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-BRASILEIRA – UNILAB*, p. 51, 2015.

ANDRICOPULO, Adriano; SALUM, Livia; ABRAHAM, Donald. Structure-Based Drug Design Strategies in Medicinal Chemistry. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 9, n. 9, p. 771–790, 2009.

ARANTES, Guilherme M. A computational perspective on enzymatic catalysis. *Química Nova*, v. 31, n. 2, p. 377–383, 2008.

BARBOSA-FILHO, José M. *et al.* Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 4, p. 392–413, 2005.

BARBOSA-FILHO, José Maria *et al.* TEOR DE BIXINA EM QUATRO VARIEDADES DE BIXA ORELLANA L. CULTIVADAS NA PARAÍBA. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 7, p. 41–47, 1998.

BIOVIA. *Dassault Systemes BIOVIA, Discovery Studio Modelling Environment, Release 4.5. Accelrys Software Inc. San Diego: [s.n.]*, 2015

BOUGUERRA NEJI, Soumaya; TRABELSI, Mahmoud; FRIKHA, Mohamed H. Esterification of fatty acids with short-chain alcohols over commercial acid clays in a semi-continuous reactor. *Energies*, v. 2, n. 4, p. 1107–1117, 2009.

BOUVIER, Florence; DOGBO, Odette; CAMARA, Bilal. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science*, v. 300, n. 5628, p. 2089–2091, 2003.

BROOIJMANS, Natasja; KUNTZ, Irwin D. Molecular recognition and docking algorithms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, v. 32, n. February 2003, p. 335–373, 2003.

CAPUCHO, H. C. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo papaína para o tratamento de feridas. *Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP*, p. 123 p., 2007.

CARDOSO, Abiney Lemos. Catalizadores Heterogêneos a base de Heteropoliácidos e Estanho para produção de Biodiesel. p. 123, 2011.

CAROLINA, Ana *et al.* Carotenoides: Pigmentos naturais como compostos bioativos. *Rev Bras Nutr Clin*, v. 26, n. 4, p. 291–299, 2011.

CARVALHO, Patrícia De O. *et al.* Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Química Nova*, v. 28, n. 4, p. 614–621, 2005.

CASTILHO, Leda dos R; *et al.* Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy. *Taylor & Francis*, p. 319–340, 2008.

CASTRO, Heizir F. De *et al.* Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, O processo de interesterificação é normalmente empregado para modificar as características físicas e propriedades das misturas de óleos e gorduras, v. 27, n. 1, p. 146–156, 2004.

CHERUBIN, Rudimar Antonio. EFEITOS DA ADIÇÃO DE BENZOATO DE SÓDIO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PARA PRODUÇÃO DE AGUARDENTE DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp*). *Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.*, p. 83, 1998.

COSTA, Charllyton Luis S. Da; CHAVES, Mariana H. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 149–152, 2005.

COSTA, Gírlene; *et al.* Análise dos parâmetros de identidades de óleos vegetais em processos de frituras descontínuas após adição de antioxidantes. *Revista Interdisciplinar*, v. 6, p. 48–53, 2013.

COYADO, Fernanda Aragão. Avaliação do potencial enzimático de micro-organismos conversores de nitrilas para a síntese de compostos de interesse farmacêutico. p. 46, 2016.

DE ALBUQUERQUE, Carlos Eduardo Rêgo. Transesterificação De Óleo De Soja Utilizando Catalisadores Ácidos Em Reator Micro-Ondas. p. 75, 2010.

DE CONTI, Roseli; RODRIGUES, José Augusto R.; MORAN, Paulo J.S. Biocatalysis: Recent advances. *Química Nova*, v. 24, n. 5, p. 672–675, 2001.

DURRANT, Jacob D.; MCCAMMON, J. Andrew. NNScore: A neural-network-based scoring function for the characterization of protein-ligand complexes. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 50, n. 10, p. 1865–1871, 2010.

DURRANT, Jacob D.; MCCAMMON, J. Andrew. NNScore 2.0: A neural-network receptor-ligand scoring function. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 51, n. 11, p. 2897–2903, 2011.

FABER, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 5th. ed. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2011.

FELIPE, Lais Keylla; ZIMMERMANN, Anita. Doenças Crônicas Degenerativas em Idosos: Dados Fisioterapêuticos. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*, v. 24, n. 3, p. 221–227, 2011.

FERNANDES, Rute. Medicamentos biológicos e biossimilares em Portugal: caracterização do mercado, do consumo e da segurança. p. 128, 2015.

FERRO, ELLEN DAIANA SOUZA; GUIMARÃES, ANA PAULA; GONÇALVES, AUGUSTO SÉRGIO LINO. Estudo De Ancoramento Molecular (Docking) De Potenciais Inibidores Da Butirilcolinesterase Humana (Hsbc). p. 2639–2645, 2019.

FERRO, Emer Suavinho. Biotecnologia translacional: hemopressina e outros peptídeos intracelulares. *estudos avançados*, v. 4, p. 109–121, 2010.

FIOROTE, Antonio José Santos. Análises de Coevolução Proteica Aplicadas ao Docking de

Proteínas. 2019.

FLORES, Taiana Desiderati Costa et al. EMPREGO DA TECNOLOGIA DE USO ÚNICO (SINGLE-USE) NA PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS. *FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ INSTITUTO*, 2019.

FORGIARINI, Eliane; ULSON DE SOUZA, Selene Maria Arruda Guelli; ULSON DE SOUZA, Antônio Augusto. Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima horseradish peroxidase (HRP). *Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos*, As atividades industriais cresceram muito nos últimos anos, gerando novos problemas devido à eliminação de rejeitos tóxicos, provenientes de subprodutos gerados pela indústria., p. 121, 2006.

FREITAS, Ícaro Bezerra. BIOESTERIFICAÇÃO DA BIXINA: UTILIZAÇÃO DA *Candida antarctica* LIPASE B. *UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-BRASILEIRA*, p. 70, 2021.

FU, Yi; ZHAO, Ji; CHEN, Zhiguo. Insights into the Molecular Mechanisms of Protein-Ligand Interactions by Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation: A Case of Oligopeptide Binding Protein. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, v. 2018, p. 1–12, dez. 2018.

FURLANI, Izadora L. *et al.* Enzyme immobilization: Concepts and effects on proteolysis. *Química Nova*, v. 43, n. 4, p. 463–473, 2020.

GARCIA, Carlos Eduardo Rocha et al. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. *Ciência Rural*, v. 42, p. 1510–1517, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000800029&lang=pt>.

GSCHWEND, DANIEL A.; GOOD, ANDREW C.; KUNTZ, Irwin D. Molecular docking towards drug discovery. *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*, v. 9, n. 2, p. 175–186, 1996.

GUZIK, Urszula; HUPERT-KOCUREK, Katarzyna; WOJCIESZYNSKA, Danuta. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties- Application to oxidoreductases. *Molecules*, v. 19, n. 7, p. 8995–9018, 2014.

HANEFELD, Ulf; CAO, Linqiu; MAGNER, Edmond. Enzyme immobilisation: Fundamentals and application. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, p. 6211–6212, 2013.

HANWELL, Marcus D *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, v. 4, n. 1, p. 17, dez. 2012.

HAVRANEK, Brandon; ISLAM, Shahidul M. An in silico approach for identification of novel inhibitors as potential therapeutics targeting COVID-19 main protease. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2020.

HELENA, Marcia *et al.* Estudos de docking molecular da interação de Bis-purinas com acetilcolinesterase para o tratamento da Doença de Alzheimer Molecular docking studies of Bis-purines interaction with acetylcholinesterase for the treatment of Alzheimer ' s disease *Universidad*. v. 1, n. 2, p. 101–118, 2020.

HUEY, Ruth; MORRIS, Garrett M.; FORLI, Stefano. Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDockTools: A Tutorial. *The Scripps Research Institute Molecular*, 2012.

JESIONOWSKI, Teofil; ZDARTA, Jakub; KRAJEWSKA, Barbara. Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption*, v. 20, n. 5–6, p. 801–821, 2014.

JESUS, I. S. De; NOGUEIRA, F. B.; FONSECA, A. M. Redução de compostos carbonílicos : os talos de mamoeiro (*Carica papaya*) como reagente biocatalisador. *Scientia Plena*, v. 9, n. 7, p. 1–8, 2013.

JÚNIO, Sérgio Dantas Oliveira. Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos. *Universidade Federal do Rio Grande do Norte*, p. 121, 2014.

KITCHEN, Douglas B. *et al.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004.

KLEIN, Theo *et al.* *Proteolytic Cleavage - Mechanisms, Function, and “omic” Approaches for a Near-Ubiquitous Posttranslational Modification*. *Chemical Reviews*. [S.l.: s.n.], 2018

LEÃO, Luana Silva. Estudo empírico e cinético da esterificação de ácidos graxos saturados sobre o ácido nióico. *Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. Dissertação (Mestrado)*, A reação de formação de ésteres através de ácidos graxos é denominada esterificação, que consiste na obtenção de ésteres a partir da reação entre um ácido graxo e um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol), com formação de água como subproduto formando um intermediário tetraédrico que posteriormente sofre um rearranjo, seguido da perda de uma molécula de água e formando uma molécula de éster, como demonstrado, p. 97, 2009.

LIMA, Aurineide Ribeiro; MARINHO, Emmanuel Silva. Alicina uma potencial aliada contra a Chikungunya (CHIKV): um estudo de docking molecular. *anais do XXIII Encontro de iniciacao a pesquisa -UNIFOR*, v. 3, n. September, 2017.

LIMA, Leonardo Ramos Paes *et al.* Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 38, n. 4, p. 196–200, 2001.

LIMA, Leonardo Ramos Paes. Efeitos farmacológico, toxicológico e mecanismo de ação dos flavonóides e corantes naturais extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) NO METABOLISMO LIPÍDICO DE COELHOS. p. 135, 2001.

LUTZ, Instituto Adolfo. *Métodos Físico-Químicos para análise de Alimentos*. [S.l.: s.n.], 2008.

MACHADO, Luciana L. *et al.* Immobilized Manihot esculenta preparation as a novel biocatalyst in the enantioselective acetylation of racemic alcohols. *Tetrahedron Asymmetry*, v. 19, n. 12, p. 1419–1424, 2008.

MANTOVANI, Nilton César *et al.* Resgate vegetativo por alporquia de genótipos adultos de urucum (*Bixa orellana* L.). *Ciencia Florestal*, v. 20, n. 3, p. 403–410, 2010.

MATEO, Cesar *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

MORRIS, G M *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.

MOTTA, Valter T. BIOQUÍMICA BÁSICA. *Medbook: Rio de Janeiro, Brasil*, p. 69–101, 2011.

NETO, ARTHUR OTÁVIO BARROS. ESTUDO DA FOTODEGRADAÇÃO DO PEAD ADITIVADO COM EXTRATO DE URUCUM. *Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais*, p. 1–54, 2018.

NEVES, Ana Alexandra dos Santos *et al.* Avaliação do Aproveitamento de Óleos Alimentares Usados Para a Produção de Biodiesel na Área Metropolitana do Porto. p. 296, 2008.

OLIVEIRA, Juliana Trench Ciampone De. Revisão sistemática de literatura sobre o uso terapêutico do ozônio em feridas. *Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.*, p. 256, 2007.

OLIVEIRA, Veridiana; SILVA, Orlando Vitor. Biotecnologia Para a Produção De Biofármacos: Farmacovigilância, Regulamentação E Mercado No Brasil. *Revista Acadêmica Oswaldo Cruz*, v. 19, p. 14, 2018.

PAUL, Biswajit *et al.* Isolation , Purification and Modification of Papain Enzyme To Ascertain Industrially Valuable Nature. *International Journal of Bio-Technology and Research*, v. 3, n. 5, p. 11–22, 2013.

PEREIRA, NATALIA DE OLIVEIRA. Extração De Papaína Presente No Látex Da Casca Do Mamão, Avaliação Enzimática E Microbiológica. p. 57, 2015.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, v. 30, n. 1, p. 70–82, 2021.

PIMENTEL, Vitor; *et al.* O desafio de adensar a cadeia de P&D de medicamentos biotecnológicos no Brasil. p. 174–211, 2013.

PINTO, Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira *et al.* Comparative study of the stability of free and modified papain incorporated in topical formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 47, n. 4, p. 751–760, 2011.

PONCIANO, João José *et al.* Desenvolvimento de membranas bioabsorvíveis com variado nível de orientação molecular para aplicação como biomaterial. p. 94, 2010.

PRIVATO, Marta Bellodi; MARTINEZ, Luis Lopez; SCHMIDT, Charles. Biofármacos no Brasil: uma revisão do processo de regulamentação / Biopharmaceuticals in Brazil: a review of the regulatory process. *Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo*, v. 65, n. 1, p. 1, 2020.

RAMÍREZ, Joaquín;; AYALA, Marcela. Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan? *Revista Digital Universitaria Universidad Autónoma de México*, v. 15, n. 12, p. 1–13, 2014. Disponível em: <<http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/#>>.

RAO, Mala B. *et al.* Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.

RAVELO, Marianela *et al.* Esterification of glycerol and ibuprofen in solventless media catalyzed by free CALB: Kinetic modelling. *Biochemical Engineering Journal*, v. 101, p. 228–236, 2015.

REIS, Carla *et al.* Biotecnologia para saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica. *BNDES Setorial*, no 29, 2009.

REZENDE, Edna Maria; SAMPAIO, Ivan Barbosa Machado; ISHITANI, Lenice Harumi. Multiple causes of death due to non-communicable diseases: a multidimensional analysis. *Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública*, v. 20, n. 5, p. 1223–1231, 2004.

RIOS, A. DE O.; MERCADANTE, Adriana Zerlotti. 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. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 15, n. 01034283, p. 203–213, 2008.

RIVERA-MADRID, Renata *et al.* Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). *Scientia Horticulturae*, v. 109, n. 2, p. 165–172, 2006.

SANTOS, Máisa da Costa. Síntese de solketal a partir de glicerol e seu uso como precursor na síntese de ésteres de solketa e monoacilglicerídeos. p. 110, 2016.

SATYANARAYANA, A.; PRABHAKARA RAO, P. G.; RAO, D. G. Chemistry, Processing and Toxicology of Annatto (*Bixa orellana* L.). *Journal of Food Science and Technology*, v. 40, n. 2, p. 131–141, 2003.

SCHMID, A. *et al.* Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, v. 409, n. 6817, p. 258–268, 2001.

SCHRODINGER LLC. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8*. . [S.l: s.n.] , 2015

SHAHID-UL-ISLAM; RATHER, Luqman J.; MOHAMMAD, Faqeer. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications - A review. *Journal of Advanced Research*, v. 7, n. 3, p. 499–514, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2015.11.002>>.

SHELDON, Roger A.; VAN PELT, Sander. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SILVA, Ana Beatriz Gomes *et al.* Doença de Parkinson revisão de literatura. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 5, p. 47677–47698, 2021.

SIMÃO, Antonia Mattos. Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico. *Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.*, 1985.

SOUZA, Cheylla Fabricia M *et al.* A Doença de Parkinson e o Processo de Envelhecimento Motor: Uma Revisão de Literatura. *Parkinson's disease and the Process of Aging Motor: Literature Review*, v. 19, n. 4, p. 718–723, 2011.

SOUZA, Livia TA *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte.

p. 530–568, 2017.

SUTHERLAND, Jeffrey J. *et al.* Lessons in molecular recognition. 2. Assessing and improving cross-docking accuracy. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 47, n. 6, p. 2293–2302, nov. 2007.

TAHAM, T.; CABRAL, F. A.; BARROZO, M. A. S. Extração Da Bixina Do Urucum Utilizando Diferentes Tecnologias. n. Figura 1, p. 16232–16239, 2015.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 2009.

VIEIRA, Liliana do Céu Gomes. Características fitoquímicas e propriedades antioxidantes do grão de café verde. *Tese de Doutorado.*, p. 53, 2015. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5550/1/PPG_23615.pdf>.

VILAR, Daniela De Araújo *et al.* Traditional Uses, chemical constituents, and biological activities of Bixa Orellana L.: A review. *Scientific World Journal*, v. 2014, p. 11, 2014.

VILAS BOAS, S. A. *et al.* AVALIAÇÃO DE SINTOMAS DE PHYTOPHTHORA ssp EM LINHAGENS DE MAMOEIRO. In: *Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22., 2012, Bento Gonçalves. Anais... Bento Gonçalves: SBF, 2012. 1 CD-ROM.*, p. 2131–2134, 2012.

ZANOTTO, Ana Patrícia. Utilização de enzimas e microrganismos para a obtenção de compostos oticamente ativos. *Universidade Federal De Santa Catarina Centro De Ciências Físicas E Matemáticas*, p. 123, 2003.