



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**ESTUDO COMPUTACIONAL DA ENZIMA *ALDEHYDE DEHYDROGENASE* DE
BIXA ORELLANA (URUCUM) E DOS LIGANTES ALDEÍDO DE BIXINA E
NORBIXINA SOB A INFLUÊNCIA DO COFATOR NAD.**

Fábio Bruno Silva de Souza

Belém–2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**ESTUDO COMPUTACIONAL DA ENZIMA *ALDEHYDE DEHYDROGENASE* DE
BIXA ORELLANA (URUCUM) E DOS LIGANTES ALDEÍDO DE BIXINA E
NORBIXINA SOB A INFLUÊNCIA DO COFATOR NAD.**

Fábio Bruno Silva de Souza

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, desenvolvido sob a orientação do Prof. Dr. Davi do Socorro Barros Brasil.

Belém–2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**ESTUDO COMPUTACIONAL DA PROTEÍNA ALDEHYDE DEHYDROGENASE DE
BIXA ORELLANA (URUCUM) E DOS LIGANTES ALDEÍDO DE BIXINA E
NORBIXINA SOB A INFLUÊNCIA DO COFATOR NAD.**

Fábio Bruno Silva de Souza

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, desenvolvido sob a orientação do Prof. Dr. Davi do Socorro Barros Brasil.

Data:
Conceito:

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Davi do Socorro Barros Brasil
Faculdade de Engenharia Química/UFGPA - Orientador

Prof. Dr. Agnaldo da Silva Carneiro
Faculdade de Farmácia /UFGPA - Membro

Prof. Dr. Antonio Maia de Jesus Chaves Neto
Faculdade de Física /UFGPA - Membro

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me permitir conhecê-lo pela fé católica e pautar a minha vida à luz de Jesus Cristo, seu Filho. Agradeço à Virgem Maria por me conduzir a Jesus em todos os setores da minha vida. Agradeço aos meus pais espirituais São João Paulo II e Santa Teresinha do menino Jesus por seus testemunhos de vida por onde eu busco pautar a minha.

Agradeço a meus pais Abelardo e Sandra Souza pelo amor, sacrifícios, dedicação e ensinamentos, sem eles eu não seria nada. Agradeço a minha irmã Bruna Amanda pelo amor, amizade, companheirismo e lealdade, amo você.

Agradeço a todos os meus familiares, tios e tias, primos e primas por estarem sempre ao meu lado, sem vocês tudo seria muito difícil, obrigado pelo amor e carinho, orientações e amizade.

Agradeço a minha amiga Celina por seu amor e lealdade, você é um presente de Deus.

Agradeço a todos os professores que fizeram e fazem parte da minha vida, em especial Teresinha minha primeira professora; a professora Lilian Marques da Silva, uma das pessoas mais maravilhosas que eu conheço, a quem devo o amor a química.

Agradeço ao professor Dr. Davi do Socorro Barros Brasil pela orientação e ensinamentos.

Agradeço ao amigo Dr. Renato Araújo da Costa e ao Dr. Carlyle Ribeiro Lima por me ajudarem no desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço ao amigo Msc. Fábio Jorge de Nazaré Ferreira por seus conselhos no desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço ao amigo Dr. Antonio Maia de Jesus Chave Neto.

Agradeço ao amigo doutorando Abel Ferreira Gomes Neto.

Agradeço as amigas que conheci no laboratório, Kelly Cristine da Silva Guimarães, Letícia Maria Martins Siqueira, Cintya Cordovil e ao amigo Jorddy Neves.

Agradeço as colegas de trabalho Rafaela e Samara do Laboratório de Engenharia Química.

Agradeço ao Rafael Souza da Faculdade Integrada Brasil Amazônia (FIBRA) pela ajuda.

A CAPES pela ajuda financeira e à UFPA pelos recursos e infra-estrutura disponibilizados para a realização deste trabalho.

RESUMO

O propósito desta pesquisa foi estudar a enzima aldehyde dehydrogenase (BoALDH) presente na semente do urucum (*Bixa orellana*), responsável pela produção do ácido carboxílico norbixina, um pigmento vermelho-alaranjado, a partir da conversão enzimática do aldeído de bixina. O pigmento possui várias aplicações tais como, corante, antioxidante e cosmetológica. A BoALDH ainda não possui a estrutura cristalográfica depositada no Protein Data Bank (PDB). Dessa forma, a estrutura 3D da enzima foi predita através da técnica de modelagem por homologia, sendo utilizado um molde homólogo vegetal de *Zea mays* (ZmALDH1a), depositado no PDB sob o código 4i8p. O modelo tridimensional foi gerado pelo procedimento HAlign-kbest. A proteína modelada apresentou o sítio ativo bem conservado em relação ao molde. Foi realizada a simulação de dinâmica molecular da proteína, utilizando o método de mecânica molecular para determinar a conformação de maior estabilidade da enzima. Após a dinâmica foi realizado o *docking* molecular do cofator NAD e dos ligantes aldeído de bixina e norbixina. Os resultados obtidos para a energia potencial dos ligantes no sítio passaram pelo teste estatístico por análise de variância (ANOVA) e mostraram que esses valores indicam maior estabilidade do reagente no domínio catalítico em relação ao produto, o que indica que ao entrar no sítio ativo o aldeído é convertido em ácido carboxílico e expulso após a reação, conforme a literatura para a superfamília das enzimas ALDH10. Além disso, o cofator exerce influência decisiva no comportamento dos ligantes no domínio catalítico, influenciando diretamente a energia de encaixe do receptor-ligante.

ABSTRACT

The main purpose of this research was to study the aldehyde dehydrogenase (BoALDH) enzyme present in the annatto seed (*Bixa orellana*), it's an orange-red pigment responsible for the production of norbixin carboxylic acid, from the enzymatic conversion of bixin aldehyde. The pigment has various applications such as dye, antioxidant and cosmetology. The BoALDH doesn't have the crystallographic structure deposited in the Protein Data Bank (PDB) yet. Therefore, the 3D structure of the enzyme was predicted by the homology modeling technique, using a *Zea mays* vegetable homologue mold deposited in the PDB on code 4i8p. The three-dimensional model was generated by the HAlign-kbest procedure. With respect to the mold, the modeled protein showed a preserved active site. The protein molecular dynamic simulation was accomplished, using the molecular mechanic method to determine the conformation of the larger enzyme stability. After the dynamic, the molecular docking of the NAD cofactor and aldehyde ligands of bixin and norbixin was performed. The results obtained to the potential energy of the ligands in the site passed the statistical test by analysis of variance (ANOVA) and they showed that these values indicate larger stability of the reagent in the catalytic domain with respect to the product, which indicates that upon entering the active site the aldehyde is converted to carboxylic acid and expelled after the reaction, in accordance with the literature to the superfamily of the ALDH10 enzymes. In addition, the cofactor performs a decisive influence on the ligands behavior in the catalytic domain, directly influencing the receptor-ligand docking energy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura da norbixina, na forma <i>cis</i> , os carbonos são representados pela cor cinza escuro, os hidrogênios por cinza claro e os oxigênios por vermelho	17
Figura 2.	Fluxograma do modo de produção natural	21
Figura 3.	Fluxograma da rota biotecnológica	23
Figura 4.	Cascata de reação a partir do licopeno culminando na bixina dimetil-éster	25
Figura 5.	Sequência primária de aminoácidos que compõem a enzima aldehyde dehydrogenase de <i>Bixa orellana</i>	26
Figura 6.	Estrutura tridimensional da proteína ZmALDH1a	26
Figura 7.	Representação da ligação peptídica em proteínas. <i>b</i> representa a distância de ligação; θ mostra o ângulo de ligação; ϕ apresenta o ângulo de torção; <i>d</i> indica o ângulo diedro	34
Figura 8.	Gráfico de RAMACHANDRAN pelo método de Molprobit com 96,1% dos resíduos em regiões favoráveis e 99,3% em regiões permitidas	41
Figura 9.	Alinhamento tridimensional realizado no software pymol, entre o molde ZmALDH1a (verde) complexado com o inibidor thiohemiacetal (verde) e a proteína modelada BoBALDH (vermelho). O valor de RMSD foi de 0,703	42
Figura 10.	Domínio catalítico da enzima ZmALDH1a, em verde. Em vermelho, o domínio catalítico da enzima BoALDH com os resíduos conservados	43
Figura 11.	Gráfico de ANOLEA, em verde resíduos energeticamente favoráveis (abaixo de zero), e em vermelho resíduos desfavoráveis energeticamente (acima de zero)	44
Figura 12.	Gráfico de RMSD (nm) vs. Tempo (ns) da proteína BoALDH	45
Figura 13.	Gráfico de RMSF (nm) vs. Tempo (ns) da proteína BoALDH	46
Figura 14.	<i>Re-docking</i> na enzima ZmALDH1a com valor igual a 1,93Å. Em cinza a posição do ligante cristalográfico NAD ⁺ , em vermelho a melhor pose obtida na simulação.	47
Figura 15.	<i>Docking</i> da pose de menor energia do cofator NAD ⁺ no sítio ativo da enzima BoALDH	49
Figura 16.	<i>Docking</i> do ligante aldeído de bixina no domínio catalítico da enzima BoALDH na presença do cofator NAD ⁺	50
Figura 17.	<i>Docking</i> da melhor pose do cofator NADH na enzima BoALDH	51
Figura 18.	<i>Docking</i> do ligante norbixina no domínio catalítico da enzima BoALDH na presença do cofator NADH	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Seleção dos PDBs das proteínas homólogas à proteína alvo	39
Tabela 2.	Pontuações de energia MolDock Score para o cofator NAD ⁺ na enzima BoALDH	48
Tabela 3.	Pontuações de energia MolDock Score para o ligante aldeído de bixina	49
Tabela 4.	Pontuações de energia MolDock Score para o cofator NADH	50
Tabela 5.	Pontuações de energia MolDock Score para o ligante norbixina	51
Tabela 6.	Teste estatístico ANOVA utilizando dois níveis de tratamento: presença e ausência do cofator NAD ⁺	53
Tabela 7.	Teste estatístico ANOVA utilizando dois níveis de tratamento: presença e ausência do cofator NADH	53

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS.

PDB	Banco de Dados de Proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
FASTA	Arquivo que contm a sequência primária da proteína
RMSD	Desvio Médio Quadrático (<i>Root Mean Square Deviation</i>)
DM	Dinâmica Molecular
MM	Mecânica Molecular (<i>Molecular Mechanics</i>)
RCSB	Site de investigação de Tecnologias para Bioinformática Estrutural (<i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics</i>)
G / GLY	Glicina ou ácido 2-aminoactico
A / ALA	Alanina ou ácido 2-aminopropinico
L / LEU	Leucina ou ácido 2-aminoisocaprico
V / VAL	Valina ou ácido 2-aminovalrico
I / ILE	Isoleucina ou ácido 2-amino-3-metil-n-valérico
P / PRO	Prolina ou ácido pirrolidino-2-carboxílico
F / PHE	Fenilalanina ou ácido 2-amino-3-fenil-propinico
S / SER	Serina ou ácido 2-amino-3-hidroxi-propinico
T / THR	Treonina ou ácido 2-amino-3-hidroxi-n-butírico
C / CYS	Cisteina ou ácido 2-bis-(2-amino-propinico)-3-dissulfeto
Y / TYR	Tirosina ou ácido 2-amino-3-(p-hidroxifenil)propinico
N / ASN	Asparagina ou ácido 2-aminossuccionmico
Q / GLN	Glutamina ou ácido 2-aminoglutarmico
D / ASP	Aspartato ou ácido 2-aminossuccnico
E / GLU	Glutamato ou ácido 2-aminoglutrico
R / ARG	Arginina ou ácido 2-amino-4-guanidina-n-valérico
K / LYS	Lisina ou ácido 2,6-diaminocaprico
H / HIS	Histidina ou ácido 2-amino-3-imidazolpropinico
W / TRP	Triptofano ou ácido 2-amino-3-indolpropinico
M / MET	Metionina ou ácido 2-amino-3-metiltio-n-butírico

SUMÁRIO

Capítulo 1

1	INTRODUÇÃO	13
---	-------------------	----

Capítulo 2

2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16

Capítulo 3

3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	URUCUM	17
3.2	APLICAÇÕES INDUSTRIAIS	18
	3.2.1 ANTIOXIDANTES	18
	3.2.2 CORANTES I	18
	3.2.3 CORANTES II	19
	3.2.4 AGÊNCIAS REGULADORAS	19
3.3	MODO DE PRODUÇÃO NATURAL	20
3.4	BIOTECNOLOGIA	21
3.5	ENZIMAS INDUSTRIAIS	21
3.6	MODO DE PRODUÇÃO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA	23
3.7	ALDEHYDE DEHIDROGENASE	23
	3.7.1 MECANISMO CATALÍTICO ENZIMÁTICO	24

Capítulo 4

4	MÉTODOS COMPUTACIONAIS	28
4.1	MODELAGEM POR HOMOLOGIA MOLECULAR	28

4.1.1	CONSTRUÇÃO DO MODELO PROTÉICO	28
	a) Identificação e seleção das proteínas- molde	29
	b) Comparação das proteínas- molde	30
	c) Alinhamento entre alvo e molde	30
	d) Construção do modelo homólogo	31
	e) Validação do modelo	31
4.2	DINÂMICA MOLECULAR (DM)	32
4.2.1	MECÂNICA MOLECULAR (MM)	33
4.3	DOCAGEM MOLECULAR (DOCKING)	35
4.3.1	FUNÇÃO DE AVALIAÇÃO	37
4.3.2	RMSD	37
4.3.3	MAPA DE LIGANTES	37
4.3.4	FUNÇÃO PONTES DE HIDROGÊNIO	38
4.3.5	FUNÇÃO HIDROFOBICIDADE	38
4.3.6	FUNÇÃO ELETROSTÁTICA	38
4.3.7	SOBREPOSIÇÃO	38
4.3.8	PROTEÍNA	38
4.3.9	ESTRUTURA MOLECULAR E OTIMIZAÇÃO	38
Capítulo 5		
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5.1	CONSTRUÇÃO DOS MODELOS PROTÉICOS	39
5.2	ESTUDO DE DINÂMICA MOLECULAR	45
5.3	ESTUDO DOS INIBIDORES ANCORADOS AO MODELO	46
5.4	DOCKING MOLECULAR	46

Capitulo 6

6	CONCLUSÕES	54
	REFERENCIAS	55

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

A planta *Bixa orellana* L. conhecida popularmente como urucuzeiro é oriunda da América do Sul e localiza-se especificamente na região amazônica. O nome popular tem origem na palavra tupi “uru-ku”, que é traduzida como “vermelho”. O principal produto é a semente que possui cobertura com elevadas concentrações de bixina, um corante do grupo dos carotenóides, cuja principal indústria de destino é a alimentícia para a substituição de corantes artificiais pelos naturais e abastece tanto o mercado nacional quanto o internacional (CORLETT *et al.*, 2007; PICOLOTO *et al.*, 2013).

As sementes do urucum apresentam em sua composição celulose (40-45%), proteínas (13-16%), óleo fixo (4,5 – 5,5%), açúcares (3,5 – 5,2%), óleo essencial (3%), vitaminas (B1, B2, C e A), e minerais (cálcio, ferro, fósforo e zinco) (COSTA, 2007). Contêm lipídios tais como ácido linoleico, e, em menor concentração, alfa-linoleico e oleico, aminoácidos como: leucina, glutamato e aspartato. São encontrados ainda diversos carotenoides: bixina, isobixina, norbixina, alfa e beta carotenos e criptoxantina (RODRIGUES *et al.*, 2007).

Estudos *in vitro* atribuíram à norbixina ação antimicrobiana frente à bactéria *Staphylococcus aureus* (GALINDO-CUSPINEIRA & RANKIN, 2005) e propriedades antioxidantes por diminuir o efeito mutagênico do peróxido de hidrogênio na molécula de DNA (SILVA JUNIOR *et al.*, 2005), além do uso como pigmento natural de cor laranja amarelada (GOOGLE PATENTS, 1987).

Na indústria cosmética, este corante pode ser acrescentado em formulações de perfumes e produtos de higiene pessoal. Os corantes utilizados em cosméticos são extraídos com álcool etílico, acetona e clorofórmio a frio (FIEAM/DAMPI, 1995).

A América Latina é a responsável pela maior parte da produção mundial de urucum (IBGE, 2009). O mercado de urucum é o responsável por 90% do total do consumo de corantes naturais no Brasil e a 70% de corantes naturais no mundo, sendo que 40% da colheita brasileira é destinada a extração de bixina (o corante), 50% a produção de colorífico e 10% para outras aplicações. O Brasil é responsável por cerca de 57% da produção mundial de urucum, estimada na faixa de 10 mil a 12 mil toneladas, no ano de 2015. Porém, a safra deste mesmo ano não atendeu com suficiência a demanda das indústrias brasileiras, que importaram o produto. Os maiores produtores

de urucum no Brasil são respectivamente: São Paulo, Rondônia, Pará e Paraná (Sociedade Nacional de Agricultura, 2015).

As propriedades do urucum chamam atenção do mercado internacional, que vem substituindo os corantes sintéticos pelos obtidos de fontes naturais, seguindo as recomendações de organismos internacionais como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Food and Agriculture Organization (FAO) (Boletim ETENE, 2010).

Diante da elevada demanda de produtos agrícolas, como o urucum, e a insuficiência em atender o mercado, o uso de enzimas em processos industriais é de grande interesse, em especial devido à facilidade de obtenção (por biotecnologia) e às vantagens em relação aos catalisadores (aceleradores de reações) químicos, com maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação. Além disso, a catálise enzimática tem outros benefícios, como o aumento da qualidade dos produtos, em relação à catálise química; a redução dos custos de laboratório e de maquinário, graças à melhoria do processo; ou a fabricação controlada de pequenas quantidades (MUSSALTO *et al.*, 2007).

O mecanismo de biossíntese dos corantes presentes no urucum ainda não está totalmente elucidado. No entanto, tem sido sugerido que um carotenoide C40 (ZECHMEISTER, 1962), mais provavelmente o licopeno, pode ser o precursor dos corantes (BRITTON *et al.*, 1998; MERCADANTE *et al.*, 1997). Baseado na semelhança estrutural entre a bixina e o pigmento do açafrão crocetina, a reação pode compreender três etapas de uma série de reações na sequência iniciada no licopeno. A enzima licopeno clivagem dioxigenase converte o licopeno em aldeído de bixina, o aldeído de bixina é convertido em norbixina pela bixina aldeído desidrogenase e, a norbixina é convertida em bixina pela norbixina metiltransferase (BOUVIER *et al.*, 2003).

A proteína Aldehyde dehydrogenase é um dos responsáveis pela produção do corante norbixina da classe dos carotenóides (BOUVIER *et al.*, 2003). A superfamília de genes aldeído desidrogenase (ALDH) compreende um grupo de enzimas envolvidas na conversão, dependente da presença de NAD(+) - ou NADP(+) -, de vários aldeídos nos seus ácidos carboxílicos correspondentes, sendo que muitos aldeídos servem como intermediários biogênicos em uma ampla gama de vias metabólicas. Além disso, muitas dessas enzimas funcionam como eliminadores de aldeído, removendo os aldeídos reativos gerados durante a degradação oxidativa (BROCKER *et al.*, 2013).

Entre as técnicas à serviço da biotecnologia encontra-se a modelagem molecular que consiste em um conjunto de ferramentas para a construção, edição e visualização,

análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos (BARREIRO *et al.*, 1997).

A estratégia de modelagem molecular por homologia baseia-se no conhecimento de que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada que sua sequência de aminoácidos durante o processo evolutivo, onde pequenas mudanças na sequência derivam em sutis modificações na estrutura tridimensional, logo se ao menos uma sequência homóloga para qual a estrutura tridimensional esteja resolvida for encontrada, é possível a aplicação do método de predição de estrutura tridimensional de uma proteína-alvo denominado modelagem por homologia (SILVA e SILVA, 2007).

A técnica de dinâmica molecular calcula as interações de átomos e moléculas em um determinado período, tornando possível o estudo do movimento das partículas (PASCUTTI, 2002).

A docagem molecular consiste em um dos métodos mais frequentemente utilizados na modelagem molecular por causa de sua capacidade de prever, com elevado grau de precisão, a conformação de pequenas moléculas ligantes dentro do local de ligação ao alvo apropriado. Tornou-se uma ferramenta essencial na descoberta de novos ligantes (MENG *et al.*, 2011; LÓPEZ-VALLEJO *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de uma rota biotecnológica que vise a otimização do processo de produção do urucum e das características físico- químicas da matéria-prima e produto apresentará benefícios tais como a redução do número de etapas no modo de produção, maior eficiência e controle sobre a reação. Portanto, o objetivo deste estudo foi o de contribuir no entendimento do mecanismo catalítico enzimático da BoALDH, etapa inicial do desenvolvimento de uma rota.

Capítulo 2

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Elucidar a estrutura tridimensional da enzima BoALDH e realizar o estudo teórico das interações desta enzima complexada aos ligantes aldeído de bixina e norbixina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a predição estrutural da enzima BoALDH por técnica de homologia molecular através do procedimento HHalign-kbest.

- Refinar o modelo gerado por homologia via método de dinâmica molecular no software GROMACS.

- Verificar a região de melhor encaixe dos ligantes aldeído de bixina e norbixina no alvo, na presença do cofator NAD, através de *docking* molecular realizado no software Molegro Virtual Docker.

- Analisar se o cofator influencia na energia potencial de encaixe dos ligantes, através do teste estatístico por análise de variância (ANOVA).

- Analisar as energias potenciais de encaixe entre o receptor e os ligantes aldeído de bixina e norbixina através da comparação entre as mesmas com a finalidade de estabelecer qual dos ligantes possui maior estabilidade no sítio ativo.

Capítulo 3

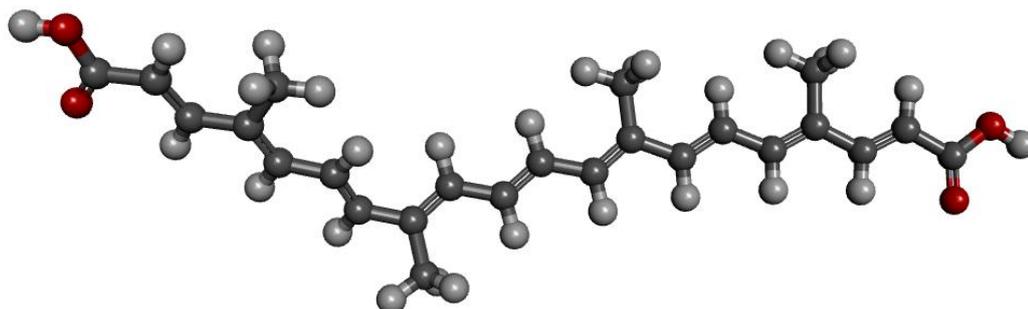
3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 URUCUM

O pericarpo maduro das sementes do urucuzeiro apresenta pigmentos de coloração amarelo-avermelhada devido à presença de substâncias de uma classe química denominada carotenoides, entre elas a norbixina (GIULIANO *et al.*, 2003).

A norbixina é hidrossolúvel e contém o grupamento carboxila, responsável por interações com moléculas de água (LIMA *et al.*, 2001), na figura 1 é apresentada a estrutura da norbixina.

Figura 1. Estrutura da norbixina, na forma *cis*, os carbonos são representados pela cor cinza escuro, os hidrogênios por cinza claro e os oxigênios por vermelho.



Fonte: Pubchem (2016).

Este composto é instável devido as insaturações presentes em sua estrutura, e em decorrência das condições de processamento sofre isomerização. O isômero *cis* da norbixina, encontra-se presente de forma natural na planta, sendo convertido na forma *trans*, mais estável, quando submetido a elevadas temperaturas. As diferenças estruturais entre os isômeros resultam em características físicas particulares (SATYANARAYANA *et al.*, 2003).

Em resumo, as diferenças estruturais entre os isômeros *cis* e *trans* da norbixina resultam em particularidades quanto à polaridade, solubilidade, coloração e, por conseguinte, determinam aplicações tecnológicas específicas (GARCIA *et al.*, 2012).

3.2 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

3.2.1 ANTIOXIDANTES

Os principais fatores responsáveis pela oxidação lipídica de derivados cárneos são a utilização de processos térmicos e de moagem, do cloreto de sódio, a composição química rica em lipídios e íons ferro. Diante disso, os antioxidantes, substâncias utilizadas para retardar ou inibir a rancidez oxidativa quando estão em concentrações inferiores aos substratos oxidáveis, têm despertado a atenção de consumidores e agências reguladoras devido a necessidade de segurança que acompanha o consumo de aditivos sintéticos (GARCIA *et al.*, 2012; HALLIWELL & GUTTERIDE, 1999).

A legislação brasileira regulamenta a utilização do urucum como corante alimentício em produtos cárneos industrializados. Porém, estudos têm demonstrado que os carotenoides presentes no urucum podem atuar como antioxidantes, possibilitando uma alternativa ao uso dos aditivos sintéticos por produtos naturais (GARCIA *et al.*, 2012).

O carotenoide norbixina presente no urucum possui uma longa cadeia de carbonos insaturados que permite adicionar radicais livres e lhe confere a capacidade de atuar como antioxidante (GARCIA *et al.*, 2012).

3.2.2 CORANTES I

As poedeiras comerciais, ou seja, galináceas, são alimentadas com rações cuja formulação contém o milho amarelo como principal fonte de pigmentos naturais (SILVA, ALBINO & GODÓI, 2000). Porém, é necessária a adição de corantes artificiais ou naturais à composição da ração com o objetivo de aumentar a coloração da gema e a aceitação dos ovos por parte dos consumidores (SILVA, ALBINO & GODÓI, 2000).

A exigência dos consumidores e a legislação dos países que proíbem a adição de corantes artificiais às rações animais e aos alimentos humanos tem feito aumentar a preferência por corantes naturais (SILVA, ALBINO & GODÓI, 2000).

3.2.3 CORANTES II

Existem várias patentes que incluem em suas composições de coloração ou sabor o carotenóide norbixina (GOOGLE PATENTS, 2003). O colorau é uma preparação comercial que contém essa substância e compõe inúmeros pratos da culinária brasileira conferindo-lhes pigmentação avermelhada. Este produto é obtido a partir das sementes de urucum, previamente aquecidas a 70° C em óleo vegetal e posteriormente passa pelo processo de abrasão com fubá ou farinha de mandioca ou ainda pela mistura destes com urucum em pó, através de extração com solventes (FERNANDES *et al.*, 2002; MERCADANTE & TOCCHINI, 2001).

3.2.4 AGÊNCIAS REGULADORAS

Segundo a EMATER em 2004, O Comitê formado pela Food and Agriculture Organization/ World Health Organization – FAO/WHO, que elaborou o documento “Joint Expert on Food Additives- JECFA, especificou identidade e pureza, além das condutas adotadas quanto ao estudo e avaliações toxicológicas, sendo tais avaliações classificadas em três grupos em relação aos corantes naturais:

1º grupo: corante isolado quimicamente inalterado de um alimento e utilizado em no produto em concentrações naturalmente nele encontrados, sendo desnecessárias informações toxicológicas.

2º grupo: corante isolado quimicamente inalterado de um alimento e utilizado no produto em concentrações superiores aos naturalmente nele encontrados, sendo necessária avaliação do corante como se fosse artificial.

3º grupo: corante isolado de um alimento e quimicamente modificado no decorrer de sua obtenção ou extração de outra fonte não alimentar, tal corante deverá ser avaliado como toxicologicamente artificial.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA é a responsável por regulamentar a utilização do urucum nas carnes estabelecendo concentração máxima de até 0,002g/100g de produto e não estabelece distinção quanto aos componentes: bixina ou norbixina e quanto à forma comercializada: extrato ou carotenoide isolado (BRASIL, 1998).

Em 2000, a resolução nº 79 da ANVISA regularizou a utilização do urucum em todos os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Em consonância com a

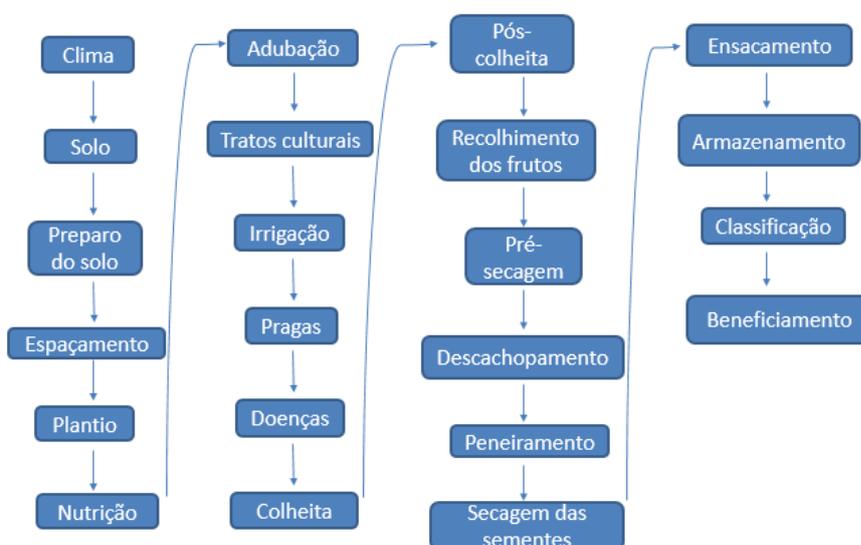
resolução normativa publicada em 1978 pela Câmara Técnica de Cosméticos do Conselho Nacional de Saúde, que classificou o urucum como corante orgânico natural possível de ser aplicado em produtos para uso externo de contato prolongado com a pele e cabelos, cavidade oral e lábios (Conselho Nacional de Saúde, 1978).

A Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal (ABIHPEC) estimou que o mercado mundial de cosméticos cresceu 9,4% em dólares em 2004, enquanto o Brasil chegou a 24,3%, após os Estados Unidos, Japão, França, Alemanha e Inglaterra. Estima-se que o faturamento nacional de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosmético em 2005, tenha sido de 14,5% maior em relação a 2004 (SILVA, 2006).

3.3 MODO DE PRODUÇÃO NATURAL

A produção do urucum passa por várias etapas até o produto final, sendo elas: as condições climáticas e de solo, escolha da variedade, escolha da gleba, análise química do solo, produção de mudas, semeadura em: sacos plásticos e canteiros, cuidado com as mudas, preparação do solo e correção da acidez, abertura e preparo das covas, plantio, adubação de cobertura, capinas, podas, irrigação, controle de pragas e doenças, culturas intercalares, colheita, classificação e embalagem, beneficiamento e comercialização (EMATER, 2000). Na figura 2 é mostrado o fluxograma do modo de produção natural.

Figura 2. Fluxograma do modo de produção natural.



3.4 BIOTECNOLOGIA

A biotecnologia consiste em um conjunto de áreas ligadas à ciência e tecnologia que envolve microbiologia, genética, bioquímica e engenharia química. Esse conjunto de áreas reunidas garante aplicações industriais em todo mundo, que visam o uso de novas matérias-primas e a otimização de processos e das características físico-químicas de matérias-primas e produtos (ABRAHÃO NETO, 2001).

3.5 ENZIMAS INDUSTRIAIS

Bilhões de dólares são movimentados anualmente, em decorrência da expansão do mercado de biotecnologia na área de enzimas (VINIEGRA-GONZÁLEZ *et al.*, 2003). O trabalho multidisciplinar de diferentes áreas de estudo tais como: microbiologia, bioquímica, química e engenharia química tem resultado na descoberta de novas enzimas e aplicações (SANT'ANNA JUNIOR, 2001), tais como: desenvolvimento de metodologias analíticas, fabricação de produtos tecnológicos e o tratamento de resíduos (EL TAYAR *et al.*, 1991). A utilização de enzimas tende a aumentar progressivamente (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

As enzimas são proteínas que tem a função de catalisar reações químicas e são essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos, além de possuir o papel de degradar a matéria orgânica, tanto ao infectar o hospedeiro quanto ao deteriorar os alimentos (LEHNINGER *et al.*, 1995).

As enzimas possuem estrutura molecular complexa, a sua constituição é formada por uma parte proteica associada a outras moléculas, tais como carboidratos e lipídeos. A esta associação denomina-se heteropolímero, a qual forma ligações covalentes, através de ligações peptídicas (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

A estrutura primária de uma enzima corresponde à sequência de seus aminoácidos, a estrutura secundária corresponde à interação desses aminoácidos com os aminoácidos adjacentes, o que forma arranjos espaciais do tipo α -hélice ou folha β . A estrutura terciária corresponde às interações entre aminoácidos que não estão próximos de forma sequencial, o que gera torções e dobramentos; esta estrutura configura o sítio catalítico da enzima, determinando a sua atividade biológica; a estrutura quaternária das enzimas corresponde à interação entre cadeias polipeptídicas (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

O benefício de empregar enzimas nos processos industriais está em sua simplicidade, facilidade de controle e eficiência energética, além do baixo custo de investimento (DZIEZAK,1991; PATEL, 2002; PIZARRO & PARK,2003; COLEN, 2006).

Uma enzima rentável à indústria é aquela capaz de garantir a obtenção de um produto final de melhor qualidade que o produto tradicional; a melhoria do processo de produção, a redução dos custos laboratoriais; a disponibilidade de produtos indisponíveis no mercado ou em quantidade reduzida (ABRAHÃO NETO, 2001).

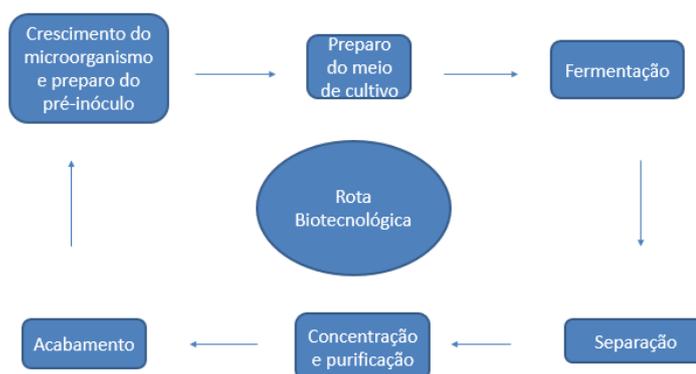
São dois os processos de produção de enzimas, a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES) (FERNANDES, 2007), onde a primeira é a mais utilizada no ocidente em decorrência da facilidade de crescimento dos microorganismos em condições controladas de pH e temperatura, além da facilidade em recuperar enzimas extracelulares, enquanto a segunda é mais utilizada no oriente, portanto será realizado um levantamento mais detalhado somente sobre a fermentação submersa (FEITOSA, 2009).

A FS utiliza um meio fermentativo líquido, onde as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis (FEITOSA, 2009) e o microrganismo se desenvolve em presença de água livre (WOICIECHOWSKI, 1997), onde a quantidade de água corresponde a mais de 95% do processo (RODRIGUES & SANTANA, 2001).

3.6 MODO DE PRODUÇÃO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

De acordo com Sant'anna Junior em 2001, a produção de enzimas em escala industrial utilizando Fermentação Submersa segue 6 etapas consecutivas, sendo elas: microrganismo em crescimento em frascos sob agitação, preparo de pré-inóculo, preparo e esterilização do meio de cultivo específico, adição do pré-inóculo ao meio de cultivo, fermentação, separação, concentração, purificação e acabamento. Na figura 3 é mostrado o fluxograma da rota biotecnológica.

Figura 3. Fluxograma da rota biotecnológica.



3.7 ALDEHYDE DEHIDROGENASE

A superfamília de genes Aldehyde dehydrogenase (ALDH) compreende um grupo de enzimas envolvidas na conversão de vários aldeídos em seus ácidos carboxílicos correspondentes na presença do cofator NAD⁺ ou NADP⁺ e que são reduzidos a forma ácida NADH ou NADPH, o que é uma fonte importante de redução para a manutenção do equilíbrio redox da célula. As enzimas ALDHs são envolvidas no processo de produção de muitos aldeídos que são intermediários biogênicos importantes no metabolismo de plantas e participam em muitas vias biossintéticas e catabólicas. (BROCKER, 2013).

A ação citoprotetora dessas enzimas durante o estresse oxidativo representa outra função importante da superfamília das ALDHs. Sob condições que induzem ao estresse oxidativo, as enzimas ALDHs atuam como removedoras de aldeídos, metabolizando aldeídos reativos produzidos em consequência da degradação oxidativa das membranas lipídicas, também conhecida como peroxidação lipídica. Muitos aldeídos derivados da peroxidação lipídica, tais como 4-hidroxinoneal (4-HNE), 4-oxononeal (4-ONE) e o malondialdeído (MDA), são potentes eletrófilos e estão prontos para formar ligações com nucleófilos fisiologicamente vitais, tais como ácidos nucleicos e proteínas. As ligações destas moléculas podem causar mutações, dificultar o desempenho das moléculas as quais se ligam e levar a perturbações significativas na homeostase do organismo (BROCKER, 2013).

Vários estudos em plantas tem demonstrado que a regulação da ALDH é um alvo comum de resposta positiva a via de ativação ao estresse. Devido a isso, existe

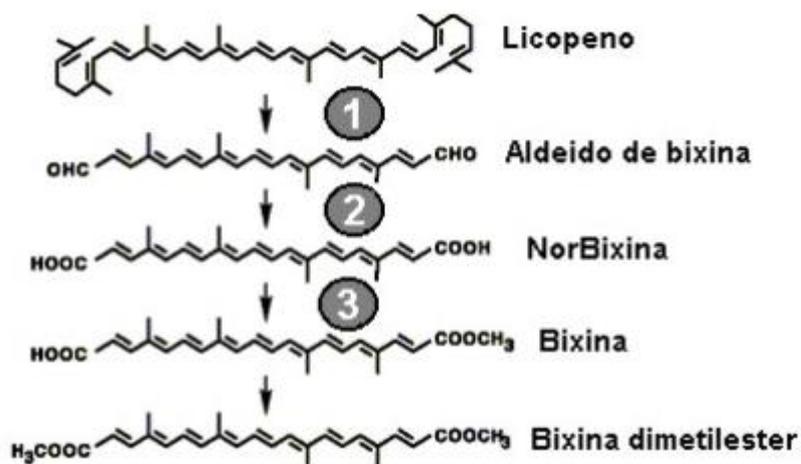
significativo interesse econômico na utilização da expressão de ALDH para melhorar o crescimento e qualidade nas culturas, em condições adversas, como a má qualidade do solo ou seca (BARTELS & SUNKAR, 2005).

Aldeído desidrogenases são encontrados em todos organismos procariotas e eucariotas, e a superfamília ALDH está bem representada dentro de praticamente todas as espécies de plantas (MISSIHOUN *et al.*, 2011; TSUJI *et al.*, 2003). Proteínas ALDHs são encontradas em plantas em numerosos compartimentos subcelulares, incluindo o citosol, mitocôndrias, plastídios (cloroplastos, cromoplastos e leucoplastos), peroxissomos e microsossomos (MISSIHOUN *et al.*, 2011; MITSUYA *et al.*, 2009). Muitas famílias de proteínas ALDHs são conservadas entre as plantas e os animais. Vários estudos demonstraram que estas enzimas compartilham uma série de substratos aldeídos (MARCHITTI *et al.*, 2008; SOPHOS & VASILIOU, 2003; TYLICOVA *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2011).

3.7.1 MECANISMO CATALITICO ENZIMATICO

O mecanismo de biossíntese da bixina ainda não está totalmente elucidado. No entanto, tem sido sugerido que um carotenoide C40 (ZECHMEISTER, 1962), mais provavelmente o licopeno, pode ser o precursor de bixina (BRITTON *et al.*, 1998; MERCADANTE *et al.*, 1997). Baseado na semelhança estrutural entre a bixina e o pigmento do açafrão crocetina, a reação pode compreender três etapas de uma série de reações na sequência iniciada no licopeno. A enzima licopeno clivagem dioxigenase (enzima 1) converte o licopeno em aldeído de bixina, o aldeído de bixina é convertido em norbixina pela bixina aldeído desidrogenase (enzima 2) e, a norbixina é convertida em bixina pela norbixina metiltransferase (enzima 3), conforme mostrado na figura 4 (BOUVIER *et al.*, 2003).

Figura 4. Cascata de reação a partir do licopeno culminando na bixina dimetil-éster.



Fonte: Bouvier *et al* (2003)

O objeto de estudo deste trabalho consiste na conversão do aldeído de bixina em norbixina pela bixina aldeído desidrogenase. Na literatura, há três resíduos estritamente conservados essenciais para a catálise: Asn, Cys e Glu. Estes resíduos encontram-se no fundo do canal do substrato e formam o sítio ativo. O mecanismo catalítico segue o modelo sequencial bem descrito válido para a superfamília ALDH10, onde os substratos aminoaldeídos são submetidos a um ataque nucleofílico pela cisteína catalítica, levando a formação de um tio éster (intermediário covalente) e a subsequente transferência de hidreto para o NAD⁺. O resíduo glutamato, conservado, funciona como uma base geral ativando uma molécula de água. Tal molécula realiza um ataque nucleofílico no tio éster na ligação acil-enxofre, resultando na liberação do aminoácido (PEREZ-MILLER & HURLEY, 2003; WYMORE *et al.*, 2004).

Até a presente data não foi determinada a estrutura tridimensional da ALDH de *Bixa orellana* por cristalografia conforme a literatura mais atualizada a respeito desta enzima (VELÍSEK *et al.*, 2008; ROSATI *et al.*, 2009; RODRÍGUEZ-AVILA *et al.*, 2011; VILAR *et al.*, 2014, SHAHID-UL-ISLAM *et al.*, 2016; SANKARI *et al.* 2016).

A sequência primária da ALDH foi determinada a partir do organismo da planta *Bixa orellana*, figura 4, e o seu gene foi clonado usando a informação da sequência do peptídeo. A ALDH possui 504 aminoácidos (BOUVIER *et al.*, 2003).

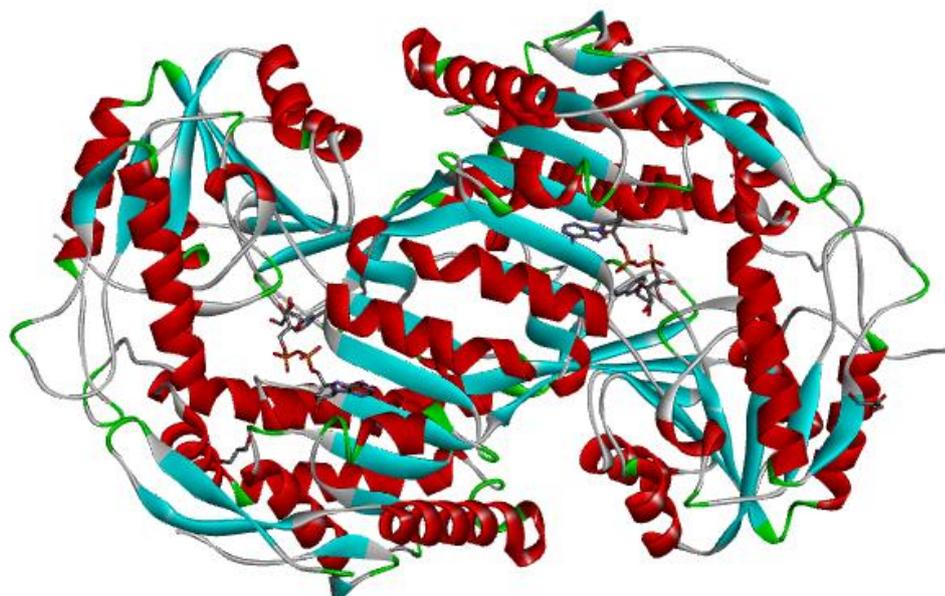
Figura 5. Sequência primária de aminoácidos que compõem a enzima aldehyde dehydrogenase de *Bixa orellana*.

```
>tr|Q70T30|Q70T30_BIXOR Aldehyde dehydrogenase OS=Bixa orellana GN=adh PE=2 SV=1
MESTGRAPLGNRIGNPGGLVVP EIKFTKLFINGRFV DNVSGQTFDTRDPRTGDVLATIA
EADKDDLDLAVKNAREAFDHGFWPRMSGYERARIMTKFADLVEAFIEELAALDTADAGKT
LSMGKAVDIPAAVQIMRYYAGAADKLHGQPLKMNQDTQGYYTLKDPIGVVGHIIPWNYPTM
MFFLKNA PALAAGCTMVV KPAEQTPLSALFYAHLARMAGVDPDGVVNVVPGFGPTAGAAVS
SHMDVDSVSFTGSQEVGRAIMRAAAQSNLKNV SLELGGKSPV IIFDDADV DMAVSLSQLA
CFTNKGEICVATSRVYVQEGIYDALVKKIVEAAREWRPDTKANMGPQVDKKQFERVLKYI
DLGKREGATLLTGKTN GDKGYI QPTIFLDVREDM NIAQDELFGPVMALMKFKTVDEAI
QKANCTKYGLAAGIVTKELNLANTVSR SIRAGAVVWNCYFGFDPDAPFGGYKMSGFGKDR
GVL AIDQYLKAKTVNTAIPNSPWY
```

Fonte: Uniprot (2016)

Em 2013, Kopecny e colaboradores apresentaram a estrutura cristalográfica da ALDH do vegetal *Zea mays* da família ALDH10 complexado com um inibidor intermediário thiohemiacetal oriundo de um aldeído derivado de polietileno glicol (PEG), o ZmALDH1a, apresentando homologia significativa com a aldehyde dehydrogenase de *B. orellana* (BoALDH), a estrutura tridimensional desta proteína apresentada na figura 5 foi depositada no banco de dados de proteínas (PDB – *Protein Data Bank*) com o código 4I8P.

Figura 6. Estrutura tridimensional da proteína ZmALDH1a.



Fonte: *Protein Data Bank* código 4I8P (2013)

A ZmALDH1a é um dímero, composto de duas subunidades denominadas cadeias A e B, cada uma das cadeias tem 595 resíduos, e são divididos em dois domínios. O domínio catalítico da ALDH em plantas é altamente conservado (KOPECNY *et al.*, 2013).

Capítulo 4

4. MÉTODOS COMPUTACIONAIS

4.1 MODELAGEM POR HOMOLOGIA MOLECULAR

A sequência de aminoácidos utilizada neste estudo foi o da ALDH de *Bixa orellana* retirada do banco de dados UniProt especificamente da família ALDH10, o código desta proteína no GenBank (Banco de Genomas) é AJ548846, ela apresentou 504 resíduos com massa molecular predita de 54, 560 KDa de acordo com o estudo de Bouvier e colaboradores (2003).

A sequência AJ548846 foi originada do sequenciamento de clones do gene correspondente do cDNA da planta *B. orellana in vitro* (BOUVIER *et al.*, 2003). Os modelos gerados partiram de um alinhamento entre alvo e a proteína-molde, e foram construídos utilizando o procedimento HAlign-Kbest, de acordo com o método apresentado a seguir.

4.1.1 CONSTRUÇÃO DO MODELO PROTÉICO

A predição de estruturas tridimensionais de proteínas é realizada através de uma ferramenta computacional, a modelagem por homologia, também denominada modelagem comparativa (ALENCAR, 2011 *apud* SANTOS FILHO, 2000; SANTOS FILHO & ALENCASTRO, 2003; THORNTON & SWINDELLS, 1993).

O mecanismo de duplicação de genes, associado às mutações, leva a divergências moleculares, desse modo são formadas as famílias de proteínas relacionadas estruturalmente (SANTOS FILHO & ALENCASTRO, 2003). Assim, proteínas derivadas de um ancestral comum são ditas homólogas (HÖLTJE & FOLKERS, 1997; SANTOS FILHO & ALENCASTRO, 2003).

A evolução molecular é o conceito que baseia a modelagem comparativa, pelo fato de partir do princípio de que a semelhança entre a estrutura primária de uma proteína problema e de proteínas homólogas de estruturas tridimensionais conhecidas (moldes) implica em similaridade estrutural entre elas. O que significa que a homologia entre sequências de aminoácidos implicará em semelhança estrutural e funcional, desta forma proteínas homólogas apresentarão regiões internas conservadas, de modo

especial, constituídas de elementos de estrutura secundária: hélices alfa e fitas beta, as principais diferenças estruturais ocorrem nas regiões externas, constituídas em geral por alças (“*loops*”), responsáveis por ligar os elementos de estruturas secundárias (SANTOS FILHO & ALENCASTRO, 2003).

A modelagem molecular por homologia tem o potencial para gerar modelos confiáveis. A condição requerida é que a semelhança entre as sequências da proteína alvo e da proteína molde seja maior que 25% (SANTOS FILHO & ALENCASTRO, 2003).

O primeiro passo para a construção do modelo proteico foi utilizar o algoritmo HHaligh-Kbest desenvolvido com base no algoritmo original HHsearch utilizado para a busca das sequências que apresentam maior identidade. Os perfis calculados no servidor são construídos utilizando o algoritmo PSI-BLAST (SÖDING, 2005; ALTSCHUL *et al.*, 1997) a construção dos modelos tridimensionais homólogos utiliza o programa MODELLER, que tem como requisito cinco etapas (ESWAR *et al.*, 2006; ALENCAR, 2011). A avaliação dos modelos e a subsequente seleção do alinhamento sub-ótimo utiliza o QMEAN4 e o Z-score (BENKERT *et al.*, 2011).

a. Identificação e seleção das proteínas-molde

Nesta etapa utiliza-se a ferramenta de busca de sequência HHblits, que está hospedado no Mobylye RPBS, que irá procurar o melhor modelo (template) para o alvo (*target*) selecionado no UniProt, se o mesmo não for fornecido pelo usuário. A construção da sequência de alinhamentos múltiplos (MSAs) pela pesquisa de sequências iterativas são um passo intermediário chave na predição baseada na conservação de propriedades na sequência evolutiva, tais como, estrutura secundária ou terciária, desordem, sítio catalítico, modificações pós-traducionais, motivos lineares curtos ou interfaces de interação. As representações condensadas das MSAs são dadas por perfis sequenciais e perfis de modelos ocultos de Markov (HMMs), responsáveis pela sensibilidade de pesquisas de sequência e a precisão de alinhamentos de sequências resultantes, que contêm para cada posição da sequência as probabilidades de observar cada um dos 20 aminoácidos de proteínas relacionadas. Em termos práticos, esta ferramenta é cerca de 1000 vezes mais rápida do que o PSI-BLAST, devido ao seu pré-filtro de sequências discretizadas que tem sensibilidade em torno de 50% a 100% maior, e gera alinhamentos mais precisos (REMMERT *et al.*, 2011).

Esse alinhamento considera a similaridade dos aminoácidos entre as sequências, ou seja, resíduos diferentes, mas com propriedades físicas semelhantes, a identidade dos aminoácidos entre as sequências, ou seja, a igualdade de resíduos, e também a diferença entre os aminoácidos da sequência, tanto físico-química quanto estrutural (ALENCAR *et al.*, 2011 *apud* SALI & BLUNDEL, 1993).

b. Comparação das proteínas molde

Realiza-se nesta etapa um alinhamento inicial das sequências primárias entre as proteínas moldes selecionadas com o objetivo de criar uma sequência base e qualificar as proteínas molde para o alinhamento com o alvo (ALENCAR *et al.*, 2011 *apud* FISER *et al.*, 2000). O alinhamento dos resíduos é tratado pelo MODELLER como se fossem estruturas equivalentes (ALENCAR *et al.*, 2011 *apud* SALI & BLUNDELL, 1993).

A seguir é realizada uma comparação entre as estruturas tridimensionais com a finalidade de escolher a melhor estrutura para a execução do alinhamento com a sequência alvo. A identidade entre as proteínas é o parâmetro que baseia esta escolha, junto com a resolução cristalográfica de cada uma das proteínas-molde (ALENCAR *et al.*, 2011 *apud* SALI & BLUNDELL, 1993).

c. Alinhamento entre alvo e molde

Nesta etapa é realizado o alinhamento de resíduos equivalentes estruturalmente, levando em conta características estruturais comuns como estruturas secundárias, α -hélices e β -folhas. Nas posições onde não são encontradas identidade nem similaridade entre o *target* e o *template*, ao invés de adicionar espaços vazios onde comumente se localizam as alças (*Gaps*) (ALENCAR SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003) é aplicado o procedimento HAlign-Kbest responsável por explorar os alinhamentos sub-ótimos a partir da sobreposição entre o alvo e as estruturas consultadas do PDB e SCOP que apresentaram menor identidade e similaridade, de forma que os segmentos desalinhados são corrigidos sem perda de precisão e melhoria significativo do alinhamento (YU *et al.*, 2015). A avaliação dos modelos e a subsequente seleção do alinhamento sub-ótimo utiliza o QMEAN4 e o Z-score (BENKERT *et al.*, 2011).

d. **Construção do modelo homólogo**

O procedimento HAlign-Kbest é responsável pela construção do modelo do esqueleto proteico, ou seja, a estrutura tridimensional, baseado nas disposições tridimensionais dos esqueletos dos moldes, complementam-se as regiões que possuam *gaps*, através deste procedimento como explicado no passo anterior, e posteriormente realiza-se o refinamento do modelo no GROMACS (ALENCAR, 2011 *apud* LEACH, 1996; SANTOS FILHO & ALENCASTRO, 2003).

As técnicas de modelagem empregadas pelo programa procedimento HAlign-Kbest baseiam-se na qualidade estereoquímica (“*modeling by satisfaction of spatial restraints*”). Considera-se que as distâncias e os ângulos correspondentes entre os resíduos alinhados no modelo e a estrutura-alvo são semelhantes e as restrições são obtidas a partir das flutuações que ocorrem em torno desta consideração. O cálculo das restrições estereoquímicas, derivadas normalmente da homologia, considera comprimentos de ligação, ângulos de ligação, ângulos diedros e interações de átomos não ligados e é realizado a partir de um campo de força de mecânica molecular (ALENCAR, 2011 *apud* MARTI-RENOM et al., 2000).

A parte hidrofóbica da proteína modelada é construída a partir do conhecimento da evolução biológica e na semelhança da estrutura e da funcionalidade existente entre proteínas homólogas. As funções de densidade de probabilidade condicional expressam tais relações e podem ser usadas como restrições espaciais de forma direta (ALENCAR, 2011 *apud* SALI; BLUNDELL, 1993).

A função objetivo é a responsável pela obtenção da estereoquímica adequada, através da combinação do método de otimização de espaço real com as restrições espaciais e as condições de campo de força e, portanto, o modelo tridimensional é gerado no espaço cartesiano por meio dela. Uma abordagem de geometria de distância constrói todos os átomos, modelos de limites inferiores e superiores, nas distâncias e ângulos diedros (ALENCAR, 2011 *apud* MARTI-RENOM et al., 2000).

e. **Validação do modelo**

A análise da confiabilidade da estrutura gerada consiste na última etapa do processo de modelagem comparativa de proteínas. O que significa que o sistema obtido deve ter a sua qualidade estereoquímica validada (MANCINI, 2011).

A distribuição dos ângulos torcionais Φ (phi) e Ψ (psi) da cadeia principal é um importante indicador da qualidade estereoquímica de uma proteína. O gráfico Ramachandran examina a distribuição destes ângulos. A análise de dados cristalográficos de um extenso conjunto de proteínas mapeou regiões que seriam aceitáveis para os valores de ângulos torcionais para resíduos de aminoácidos para a composição tridimensional da proteína e identificou regiões correspondentes referentes a estruturas secundárias (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968).

O gráfico de Ramachandran - é constituído de quatro regiões. As regiões não-permitidas são aquelas em que são ocupadas por aminoácidos com problemas estereoquímicos. Um modelo ideal deve apresentar mais de 90% de resíduos em regiões favoráveis (JOHNON *et al.*, 1994). Sendo aceito como validos modelos com percentagens acima de 80% de resíduos em regiões mais favoráveis energeticamente (ALENCAR *et al.*, 2011).

O cálculo do desvio médio quadrático (RMSD –Root Mean Square Deviation) - determina a similaridade entre a estrutura modelada e a proteína molde através da sobreposição destas estruturas tridimensionais. Portanto, o cálculo do RMSD é realizado após um alinhamento tridimensional entre as estruturas, sendo consideradas as coordenadas da espinha dorsal da proteína, os carbonos alfa ($C\alpha$). Alinhamentos sem identidade e espaços vazios prejudicam o resultado. Os valores considerados válidos são aqueles abaixo de 3,5 Å, obtidos após a otimização e superposição do modelo construído (ALENCAR, 2011 *apud* ARNOLD *et al.*, 2006). Para valores que se aproximam de zero têm-se menores desvios entre as proteínas, logo melhores serão os modelos gerados por homologia (ALENCAR, 2011 *apud* SALI & BLUNDELL, 1993).

A classificação enzimática (EC) possui três níveis de informações: (1) o nível mais inferior, associado aos metabólitos que agem como substratos (entrada) e produtos (saída) de reações enzimáticas, (2) o nível intermediário constituído pelas enzimas que realizam a reação enzimática através da qual é possível a interferência através de drogas de inibição, e (3) o mais alto nível de organização é dado pela via metabólica em que as enzimas estão inseridas (ALTMAN *et al.*, 2013).

A identidade é a porcentagem de resíduos iguais entre duas sequências, quanto maior o número de resíduos idênticos maior a probabilidade de uma ascendência comum.

A similaridade é a comparação entre duas ou mais sequências, que podem até apresentar baixa identidade, porém alinham inequivocamente e conservam resíduos em

todas as sequências, o que significa preservar a função do aminoácido em decorrência da posição que ocupa (KOONIN & GALPERIN, 2003).

4.2 DINÂMICA MOLECULAR (DM)

A estereoquímica do modelo predito pode ser refinada através da técnica de dinâmica molecular, o que significa que por este método é possível favorecer energeticamente a estrutura do modelo (MARTI-RENOM, 2000).

A dinâmica molecular (DM) consiste em uma técnica de simulação computacional que calcula a interação de átomos e moléculas no decorrer de um período de tempo, sendo possível o estudo do movimento das partículas (PASCUTTI, 2002). A técnica é fundamentada nas equações do movimento da mecânica clássica e mecânica estatística, nos métodos quânticos e potenciais de interação entre as partículas do sistema. Em biomoléculas, auxilia na busca da conformação mais estável do sistema proteico (ALENCAR, 2011).

A dinâmica molecular foi realizada com o campo de força Charmm22*, a um pH 7, isto é, com Glu e Asp desprotonados, Arg e Lys protonados, e Hys neutra. Este campo de força foi capaz de dobrar adequadamente a proteína que foi solubilizada em água. A proteína foi centrada em uma caixa cúbica contendo moléculas de água do tipo TIP3P, a extensão da caixa foi de 1,5 nm. Foram adicionados íons sódio (Na⁺) e cloreto (Cl⁻) para assegurar a neutralidade do sistema ao redor da proteína. O sistema foi submetido a uma minimização de energia com curva logarítmica descendente, seguido de um 1ns de DM em conjunto NPT e 1 ns de DM em conjunto NVT com um termostato de velocidade-reescalonado encontrado para amostra do conjunto canônico (LIMA *et al*, 2016).

O programa Gromacs (versão 5.0.4) foi utilizado para executar as simulações de DM com condições de contorno periódicas. Os comprimentos de ligação com átomos de hidrogênio foram fixados com o algoritmo LINCS e as equações de movimento foram integradas com um tempo de 2fs. As interações eletrostáticas foram calculadas usando o método de malha de Ewald e um corte de 1,1 nm. Foi utilizado um corte de 1,2 nm para as interações de Van der Waals. As listas de pares não ligados foram atualizadas a cada 10fs. A análise é baseada em 100ns de DM à 300 K. As estruturas geradas foram avaliadas em relação à estrutura minimizada usando o desvio médio da raiz quadrática,

ou seja, root mean square deviation (RMSD) e agrupado utilizando um corte (cutoff) de RMSD de 3Å (LIMA *et al.*, 2016).

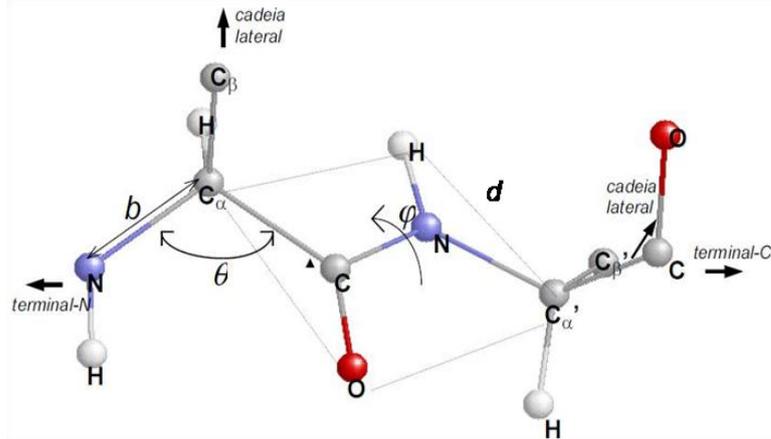
4.2.1 MECÂNICA MOLECULAR (MM)

As leis da física clássica são utilizadas para prever propriedades estruturais e moleculares nos métodos baseados na mecânica molecular. Dessa forma, é calculada a energia de um sistema em função das posições nucleares, enquanto são ignorados os movimentos dos elétrons. Portanto, a MM torna-se um método adequado para tratar sistemas contendo um número grande de átomos, como os sistemas proteicos, pois o custo computacional é baixo e dependendo dos parâmetros adotados no campo de força, os resultados podem ser tão bons quanto o método quântico (MANCINI, 2011 *apud* FRANÇA, 2004; HIGGINS; TAYLOR, 2001; CRAMER, 2004).

A MM utiliza um campo de forças para o cálculo de sistemas, constituído de um conjunto de equações empíricas e parâmetros. Cada sistema específico possui um campo de forças parametrizado, os sistemas biomoleculares utilizam comumente campo de forças como o CHARMM (BROOKS *et al.*, 1983; MACKERELL *et al.*, 1998; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008), OPLS (JORGENSEN; MAXWELL; TIRADO-RIVES, 1996; JORGENSEN; TIRADO-RIVES, 1988; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008) e AMBER (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008; WEINER *et al.*, 1984, 1986).

As forças intra e intermoleculares atuantes no sistema são forças harmônicas ou elásticas, descritas em função dos comprimentos de ligação (b), ângulos de ligação (θ), ângulos de torção (ϕ), e interações entre átomos não ligados (d) e são mostradas na figura 6 (ALENCAR, 2011).

Figura 7. Representação da ligação peptídica em proteínas. b representa a distância de ligação; θ mostra o ângulo de ligação; φ apresenta o ângulo de torção; d indica o ângulo diedro.



Fonte: Alencar (2011)

Essas forças são correlatas a quatro componentes que compõem um simples conjunto próprio a maioria dos campos de força, isto é, a soma de vários termos de energia, o que inclui os termos para átomos ligados, representado pelos comprimentos e ângulos de ligação e ângulos diedros, e os termos para átomos não ligados, tendo como representante interações de Van der Waals e de Coulomb. A equação 1 descreve um típico campo de forças:

$$v(r^N) = \sum \frac{ki}{2} (r_i - r_{i,0})^2 + \sum \frac{ki}{2} (\Theta_i - \Theta_{i,0})^2 + \sum V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \sum_{i=j}^N \sum_{i=j}^N (4\epsilon_{ij} [\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}]^{12} - (\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}})^6) + \frac{qiqj}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (1)$$

Onde:

$v(r^N)$ corresponde a energia potencial total, em função das posições (\mathbf{r}) de N partículas (em geral, átomos). As interações entre pares de átomos ligados são evidenciados pelo primeiro termo, que é modelado pelo potencial harmônico que dá aumento na energia quando o seu comprimento r_i desvia do valor de referência $r_{i,0}$. A soma sobre todos os ângulos de valência (A-B-C) na molécula é representado pelo segundo termo. O potencial torcional que modela como a energia varia quando as ligações giram é dado pelo terceiro termo. O cálculo entre todos os pares de átomos (i e j) que se encontram em diferentes moléculas ou na mesma molécula, porém separados por no mínimo três ligações corresponde a interação entre todos os pares de átomos não ligados e é equivalente a quarta contribuição (MANCINI, 2011).

Quando se trata de um campo de forças simples o termo não ligado é normalmente calculado através de um termo de potencial de Coulomb para interações eletrostáticas e um termo de potencial de Lennard-Jones para as interações de *Van der Waals*, como é encontrado na equação 1.

4.3 DOCAGEM MOLECULAR (*docking*)

O processo de docagem molecular corresponde à predição da conformação do ligante e sua orientação no interior do sítio de interação da proteína. O entendimento do mecanismo de interação de um ligante à uma proteína alvo é essencial para o conhecimento do posicionamento tridimensional e das interações moleculares envolvidas no processo. A docagem molecular contida no campo da modelagem molecular visa obter a predição da geometria e da energia de interação tanto para o planejamento de novos medicamentos (IWATA *et al.*, 2000) quanto para o desenvolvimento de novos processos e produtos biotecnológicos. Esta técnica de simulação calcula os valores das estruturas mais estáveis do complexo proteína-ligante fornecendo os resultados com maior estabilidade relativa (GUIMARÃES, 2010; SILVEIRA, 2003; MANCINI, 2011).

O programa Molegro Virtual Docker (MVD) aplica o algoritmo Moldock, baseado em um algoritmo de busca híbrido, denominado guia de evolução diferencial que combina a evolução técnica de otimização diferencial com algoritmo que prevê a cavidade. A função de pontuação de acoplamento Moldock baseia-se em um potencial de interpolação linear, definido pelos seguintes termos energéticos:

$$E(\text{score}) = E(\text{inter}) + E(\text{intra}) \quad (2)$$

Onde:

$E(\text{inter})$ é a energia de interação da proteína e do ligante e $E(\text{intra})$ é a energia interna do ligante. A $E(\text{inter})$ é determinada pela equação:

$$E_{\text{inter}} = \sum_{i=\text{ligante}} \sum_{j=\text{proteína}} [E_{\text{PLP}}(r_{ij}) + 332,0 \frac{q_i q_j}{4\pi r_{ij}^2}] \quad (3)$$

O termo E(PLP) é um potencial linear porque usa dois diferentes conjuntos de parâmetros: um conjunto para aproximar o termo estérico (*Van der Waals*) entre átomos e outro potencial mais forte para pontes de hidrogênio (THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006).

A E(intra) é calculada pela seguinte equação:

$$E_{\text{inter}} = \sum_{i=\text{ligante}} \sum_{j=\text{proteína}} [E_{\text{PLP}}(r_{ij}) + \sum_{\text{ligações flexíveis}} A[1 - \cos(m\Theta - \Theta_0)] + E_{\text{clash}} \quad (4)$$

O primeiro termo apresenta dupla somatória e calcula todos os termos energéticos que envolvem pares de átomos do ligante, exceto aqueles ligados por duplas ligações. O segundo termo apresenta o cálculo do somatório da energia de torção, onde teta é o ângulo de torção da ligação. A contribuição média dos termos de energia de torção são usados se as torções podem ser determinadas. O último termo, E(clash) atribui uma penalidade de 1000 se a distância entre dois átomos for inferior a 2 Å (duplas ligações) (LIMA *et al.*, 2014).

A triagem (*screening*) da forma mais estável do ligante combinado com a minimização de energia objetiva encontrar a conformação mais estável e consistente do ligante na forma ativa do receptor (BoBALDH). As poses candidatas foram salvas em Mol2.

Para os inibidores aldeído de bixina e norbixina foram calculadas 10 cavidades, sendo utilizada a cavidade 2 (volume 76,8 Å³ e superfície de 264,96 Å²) e coordenadas X= -10,96, Y=-0,67 e Z= 40,95, e raio 15 da enzima BoALDH com um grid de resolução de 0,30 e com parâmetros de iteração máxima de 1500, o tamanho máximo da população é 50 e a pose de geração de energia é 100. É usado o passo evolucionário simplex 300 e distância máxima do fator evolutivo 1 (Molegro Virtual Docker, 2010; THOMSEN and CHRISTENSEN, 2006; THOMSEN and CHRISTENSEN, 2009).

4.3.1 FUNÇÃO DE AVALIAÇÃO

A função de avaliação interna do Molegro Virtual Docker usou o algoritmo MolDock Score Optmizer para selecionar e rediferenciar a posição para cada substância. O algoritmo MolDock Score utilizado na avaliação de campo de funções que estimam a interação de energia interna do ligante e do ligante com o receptor. O campo magnético foi usado para resolver os parâmetros eletrostáticos através do mesmo algoritmo. Cada

acoplamento foi minimizado pela função de avaliação com cálculos de mecânica molecular gerando resultados como MolDock Score (mesmo nome do algoritmo), RerankScore, RMSD e Hbond.

4.3.2 RMSD

O cálculo do desvio médio quadrático (*Root-Mean-Square-Deviation*) é executado entre um ligante de referência e as poses geradas por *docking* molecular com o objetivo de verificar a reprodutibilidade do algoritmo utilizado. Na equação abaixo é mostrado como é realizado o cálculo do RMSD.

$$\text{RMSD} = \sqrt{\sum_i^N \frac{(x_i - \bar{x})^2}{N}} \quad (5)$$

Onde:

x_i : é o valor da variável x desde i ; \bar{x} : é o valor médio da variável x .

4.3.3 MAPA DE LIGANTES

A barra de ferramentas do software Molegro Virtual Docker contém quatro botões de alternância, entre eles o botão *Ligand Map* usado para ativar a visualização bidimensional (2D) das interações estéricas, pontes de hidrogênio e estáticas entre os resíduos da proteína e os ligantes.

4.3.4 FUNÇÃO PONTES DE HIDROGÊNIO

Esta função mostra as interações de pontes de hidrogênio e pode ser obtida a partir do *Ligand Map* ou através dos cliques em *View* e em *Hydrogen Bond Interaction*.

4.3.5 FUNÇÃO HIDROFOBICIDADE

A superfície hidrofóbica pode ser criada a partir dos cliques em *View* e depois em *Hydrophobicity*.

4.3.6 FUNÇÃO ELETROSTÁTICA

A superfície eletrostática pode ser criada a partir dos cliques em *View* e depois em *Electrostatic Interaction*.

4.3.7 SOBREPOSIÇÃO

A sobreposição das estruturas foi realizada abrindo o arquivo contendo a proteína e as estruturas docadas e em seguida importando a estrutura que se deseja sobrepor sobre as estruturas docadas, no arquivo aberto, através do botão *Import Molecules*.

4.3.8 PROTEINA

A estrutura da proteína utilizada para a docagem molecular foi a da BoALDH, na ausência de água.

4.3.9 ESTRUTURA MOLECULAR E OTIMIZAÇÃO

As estruturas moleculares do aldeído de bixina, norbixina, NAD⁺ e NADH foram obtidas a partir do banco de dados PUBCHEM e foram otimizadas no software GAUSSIAN09.

Capítulo 5

1. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CONSTRUÇÃO DOS MODELOS PROTEÍCOS

A seleção dos PDBs das proteínas que têm identidade com a proteína alvo (BoALDH) foi realizada através de alinhamentos prévios. Os resultados são apresentados na tabela 1 e mostram a classificação enzimática, as identidades, valores de penalidades, similaridade e resolução gerados pelo procedimento HAlign-kbest, das proteínas que tiveram identificação com o alvo.

Tabela 1. Seleção dos PDBs das proteínas homólogas à proteína alvo.

Proteínas	Número de resíduos	EC	Identidade (%)	Similaridade (%)	<i>e-value</i>	Resolução (Å)
4I8P	520	1.2.1.19	39	69,20	2E-105	1,95
4QTO	520	1.2.1.8	37	68,40	2E-104	1,65
4I9B	517	1.2.1.19	39	72,30	3E-104	1,90
1A4S	503	1.2.1.8	37	67,20	4E-104	2,10
3I44	497	1.2.1.--	36	59,90	1E-103	2,00
2O2P	517	1.2.1.8	43	77,60	1E-103	1,70
1WND	495	1.2.1.19	39	63,70	1E-103	2,10
3EK1	504	1.2.1.16	35	60,80	1E-103	2,10
4O5H	511	1.2.1.39	43	74,20	3E-104	2,00
1BXS	501	1.2.1.36	49	85,30	9E-103	2,35
2D4E	515	1.2.1.60	40	66,80	8E-103	2,10
4U3W	505	1.2.1.3	37	65,00	3E-103	1,95
3IFG	484	1.2.1.16	36	60,70	3E-103	2,70
4LIH	504	1.2.1.3	44	75,10	2E-103	1,85
4JZ6	500	1.2.1.65	32	51,10	8E-103	2,42
4O6R	496	---	42	76,80	2E-102	1,90
1O04	500	1.2.1.3	51	86,10	5E-107	1,42
3U4J	528	---	41	72,50	7E-102	2,00
4F3X	498	1.2.1.3 – 1.2.1.8	36	62,10	3E-107	2,01
3JZ4	481	1.2.1.16	37	63,50	4E-102	2,30

Fonte: O Autor (2016)

A sequência ALDH de *B. orellana* tem 504 aminoácidos em cada cadeia (A e B) e possui um homólogo claro a enzima aminoaldehyde dehydrogenase pertencente a planta *Zea mays* (ZmAMADH1a), de código 4I8P no PDB, e o valor de EC igual a 1.2.1.19, sendo este o principal parâmetro na escolha do homólogo, com 39% de identidade, 60,20% de similaridade e resolução cristalográfica com o valor de 1,95 Å.

Entretanto, a enzima aminoaldehyde dehydrogenase da planta *Solanum lycopersium* (SlAMADH1), de código 4I9B, foi ranqueada como o terceiro melhor *template*, apesar de apresentar os mesmos valores de EC e identidade que a enzima de código 4I8P, e um valor de similaridade superior a esta (72,30%). Neste caso, o valor do *e-value*, ou seja, do erro da enzima SlAMADH1 (2E-104) é muito maior quando comparado a da ZmAMADH1a (2E-105).

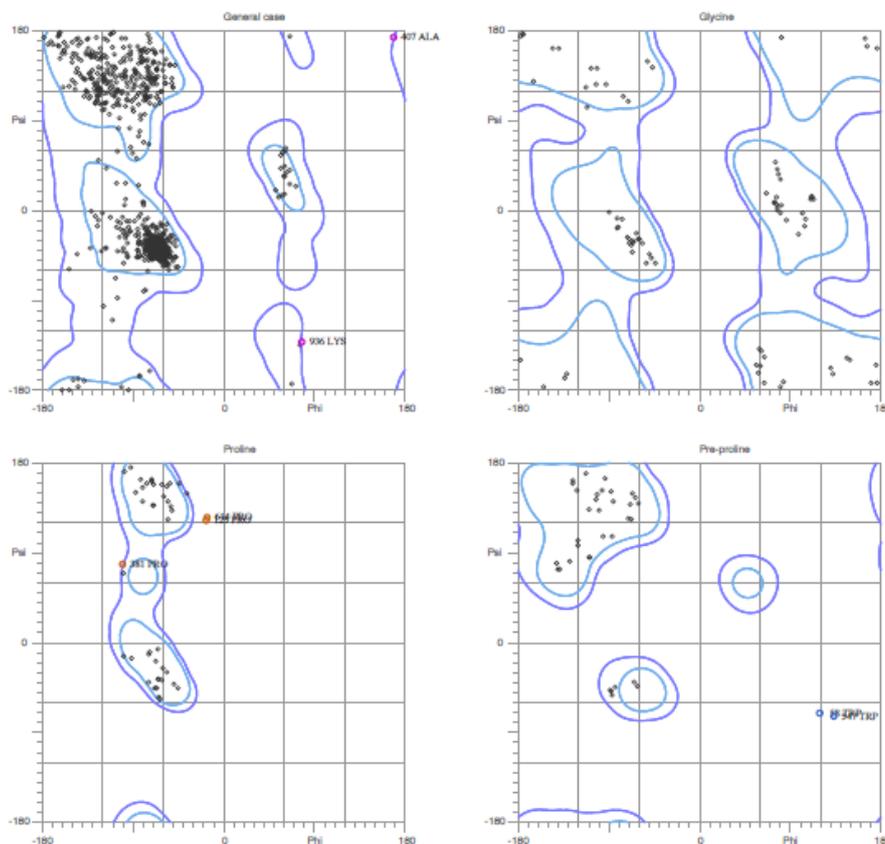
A enzima homóloga aldehyde dehydrogenase presente na mitocôndria humana de código pdb 1o04 foi ranqueada em décimo sétimo lugar, apesar de apresentar os melhores valores de identidade, similaridade, *e-value* e resolução. O parâmetro decisivo para que esta enzima não seja a melhor escolha como *template* foi o EC, pois a via metabólica do organismo a qual ela pertence é incompatível com a via da enzima BoALDH, um organismo vegetal.

O procedimento HHalign-Kbest contendo o algoritmo HHsearch foi utilizado para realizar o alinhamento entre o *template* e o *target* considerando o domínio catalítico das duas enzimas.

Após este procedimento, foi gerado o melhor modelo tridimensional para a proteína alvo, através do procedimento HHalign-Kbest acoplado ao software MODELLER.

O gráfico de RAMACHANDRAN pelo método de Molprobitry foi construído afim de avaliar a estereoquímica do modelo. O número de aminoácidos localizados em regiões com ângulos favoráveis é dado em porcentagem, o valor para o modelo gerado corresponde a 96,1% dos resíduos em regiões favoráveis e 99,3% dos resíduos em regiões permitidas, mostrado na figura 8.

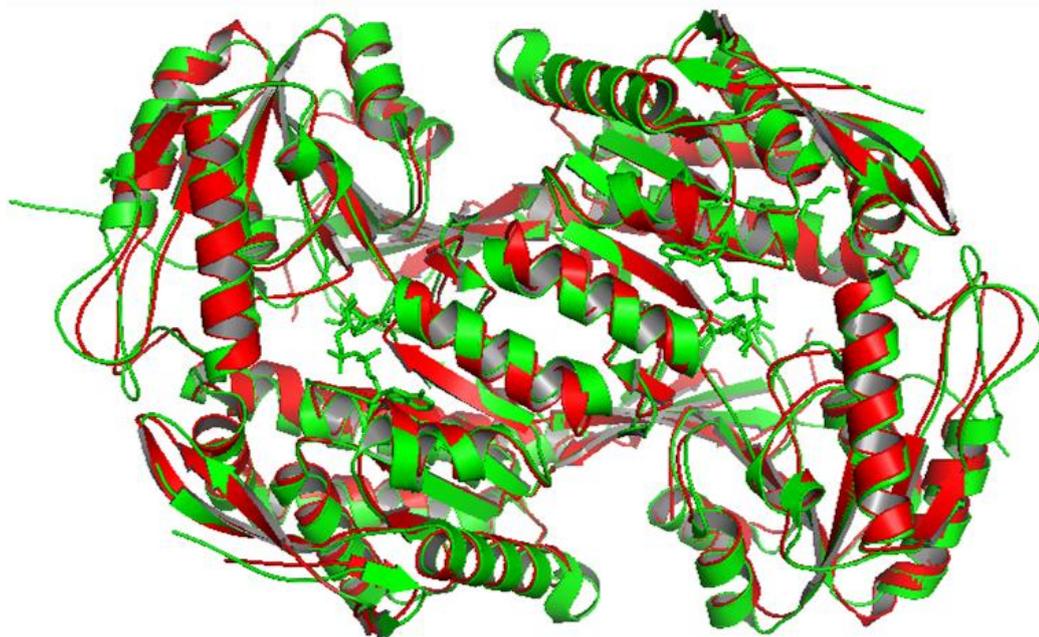
Figura 8. Gráfico de RAMACHANDRAN pelo método de Molprobit com 96,1% dos resíduos em regiões favoráveis e 99,3% em regiões permitidas.



Fonte: PSVS 1.5

O valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) obtido no modelo gerado foi de 0,703 Å. Este baixo valor no desvio indica que a estrutura tridimensional construída satisfaz as condições exigidas durante a evolução (ARNOLD *et al.*, 2006). A figura 9 apresenta o alinhamento tridimensional entre o domínio catalítico BoALDH e o domínio da enzima ZmALDH1a.

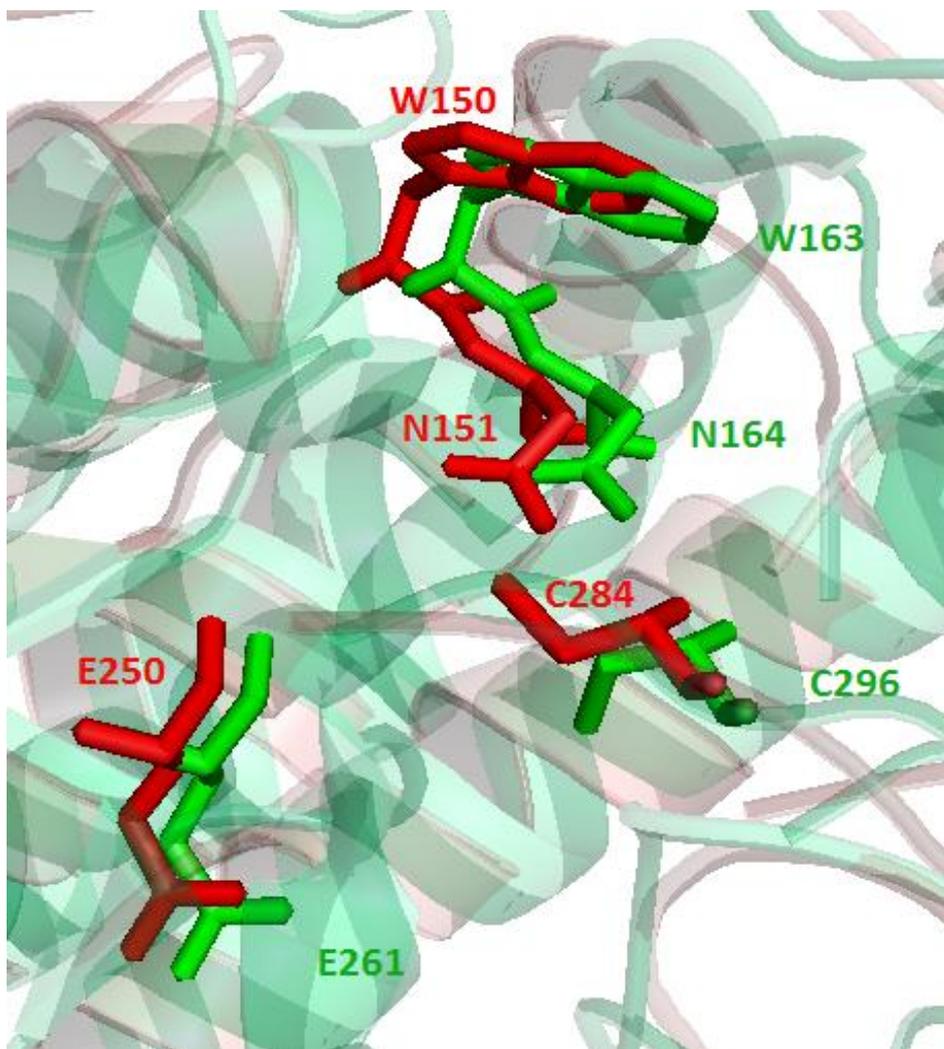
Figura 9. Alinhamento tridimensional realizado no software pymol, entre o molde ZmALDH1a (verde) complexado com o inibidor thiohemiactal (verde) e a proteína modelada BoBALDH (vermelho). O valor de RMSD foi de 0,703.



Fonte: O Autor (2016)

O sítio ativo da BoALDH obtido através da homologia, quando comparado com o sítio ativo da ZmAMADH, na figura 10, demonstra as interações que o inibidor thiohemiactal (no centro em verde) faz com os resíduos importantes do sítio das enzimas. Os resíduos W163, N164, C296 e E261 da ZmAMADH são conservados na enzima BoALDH através das posições 150, 151, 284 e 250.

Figura 10. Domínio catalítico da enzima ZmALDH1a, em verde. Em vermelho, o domínio catalítico da enzima BoALDH com os resíduos conservados.

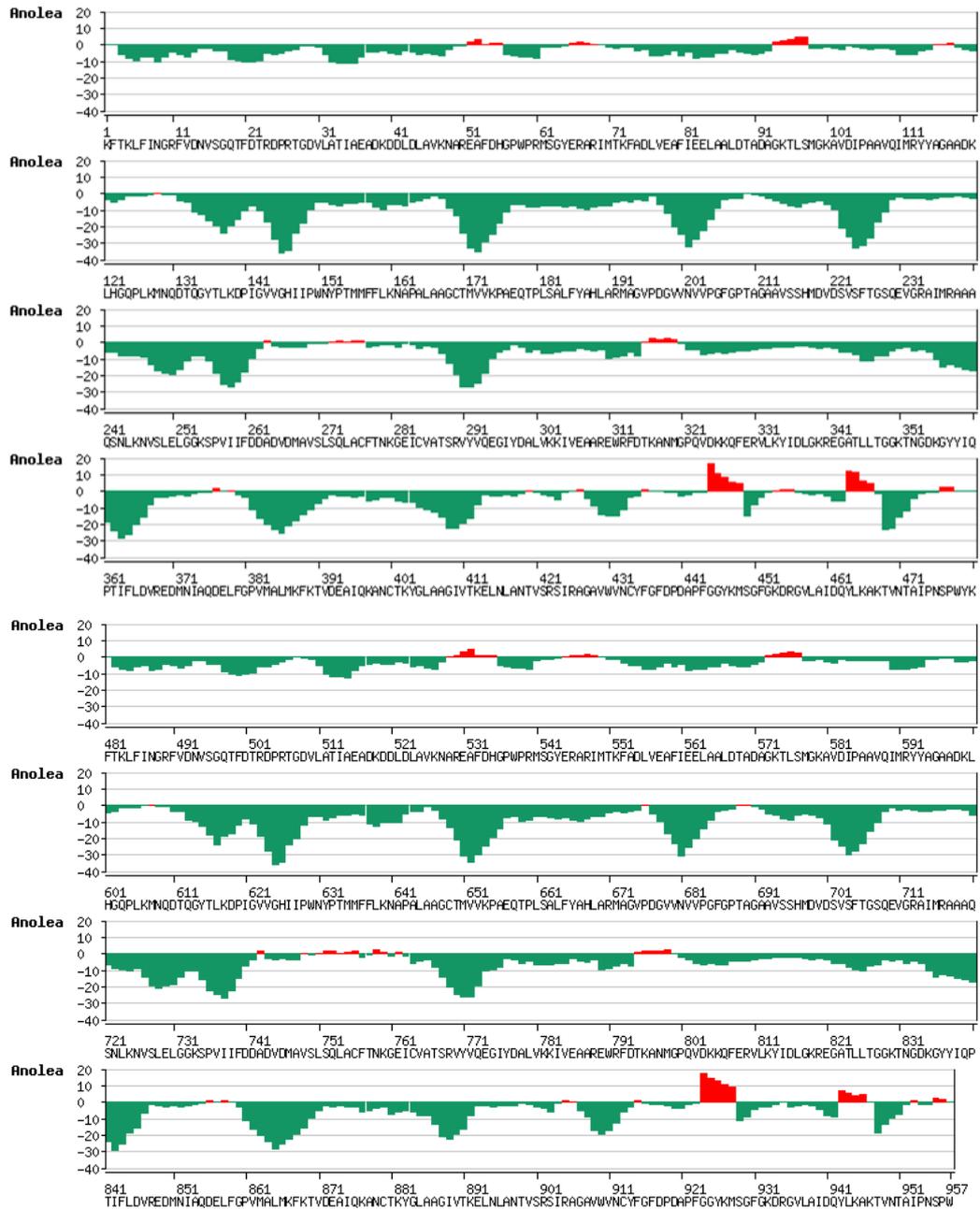


Fonte: O Autor (2016)

A estimativa da qualidade global do modelo gerado foi avaliada através do score verify3D com um valor de 0,40, uma boa pontuação, o modelo construído atingiu 70% do valor máximo alcançável, o que significa que há uma boa compatibilidade do modelo tridimensional com sua própria sequência de aminoácidos (BOWIE *et al.*, 1991; LUTHY, *et al.*, 1992).

A estimativa da qualidade local do modelo foi realizada pelo gráfico de ANOLEA apresentado na figura 11, demonstrando valores de energia negativos, ou seja, favoráveis a qualidade do modelo, para boa parte dos resíduos proteicos, em especial a tríade catalítica (W163, N164 e C284) e aminoácidos vizinhos.

Figura 11. Gráfico de ANOLEA, em verde resíduos energeticamente favoráveis (abaixo de zero), e em vermelho resíduos desfavoráveis energeticamente (acima de zero).

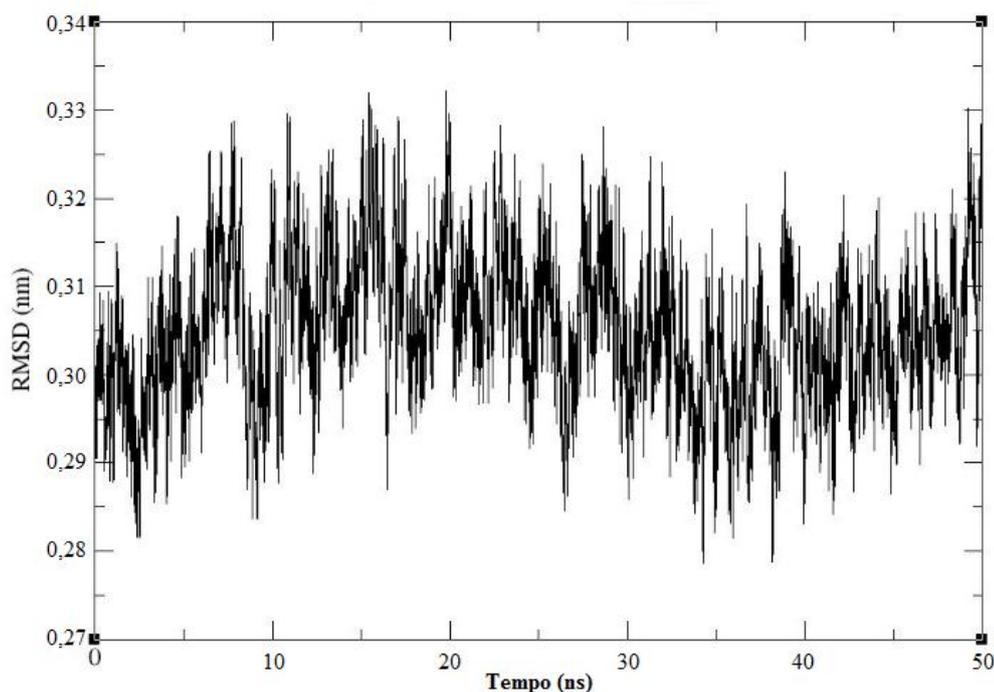


Fonte: O Autor (2016)

5.2 ESTUDO DE DINÂMICA MOLECULAR

O RMSD é uma medida global do sistema em função do tempo. O refinamento do modelo obtido por homologia foi obtido através de 50 ns dinâmica molecular, onde foi verificada a estabilidade do modelo através do baixo desvio sofrido pelo modelo no decorrer do tempo e de uma certa constância nos últimos 10 ns. O RMSD médio da estrutura minimizada foi de 2,385 Å.

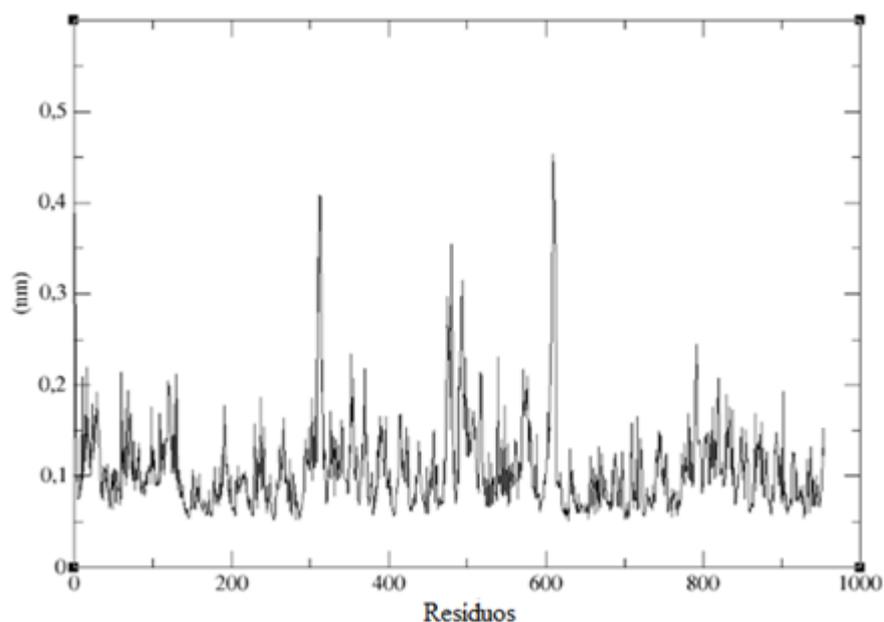
Figura 12. Gráfico de RMSD (nm) vs. Tempo (ns) da proteína BoALDH.



Fonte: O Autor (2016)

A análise de flutuação média quadrática (RMSF) é uma medida de mudanças locais, os valores mostrados no gráfico, na figura 13, referem-se a espinha dorsal, ou seja, carbonos alfa, dos resíduos no período de 50 ns. Os átomos dos resíduos W150, N151, E250 e C284 apresentaram baixo valor de flutuação, em torno de 1 Å, assim como a maioria dos resíduos. No entanto, os resíduos em torno da posição 300, 500 e 600 apresentaram elevado RMSF, o que significa que estes resíduos apresentam baixa estabilidade energética e que precisam de um tempo de dinâmica maior que 50 ns para alcançarem este estado.

Figura 13. Gráfico de RMSF (nm) vs. Tempo (ns) da proteína BoALDH.



Fonte: O Autor

5.3 ESTUDO DOS INIBIDORES ANCORADOS AO MODELO

A estrutura do enzima BoALDH foi utilizada para o estudo de *docking* de dois cofatores (NAD⁺ e NADH) e dois inibidores (aldeído de bixina e norbixina), a partir do conhecimento do mecanismo catalítico enzimático da superfamília de enzimas ALDH10 (PEREZ-MILLER & HURLEY, 2003; WYMORE *et al.*, 2004), da conformação espacial e da localização do domínio catalítico fornecido pelo *template* da enzima ZmALDH1a (código pdb :4I8P) utilizado para a predição estrutural da BoALDH, bem como dos cofatores na região circunvizinha (KOPECNY *et al.*, 2013).

5.4 DOCKING MOLECULAR

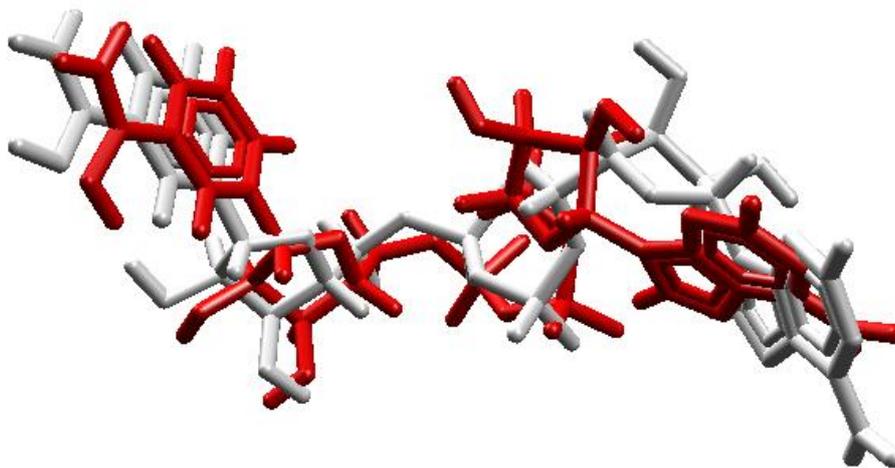
A validação dos acoplamentos foi utilizada para garantir a orientação e a posição de ligação, obtidas a partir de estudos de *docking* pelo programa MVD com dez replicações de cada corrida do ligante. Em seguida, os parâmetros foram validados na estrutura cristalina do receptor, neste caso o *template* do modelo gerado.

O cofator NAD⁺ da enzima ZmALDH1a (código pdb: 4I8P) foi extraído e colocado no sitio ativo, através do *re-docking*, para determinar a interação do ligante no

domínio catalítico e determinar a capacidade de orientação e posição do cofator que foi observada na cavidade ligante-receptor da estrutura do cristal.

Os resultados indicam que o programa Molegro Virtual Docker através do método de *docking* apresentou boa orientação espacial do complexo de ligação do ligante-receptor, sendo capaz de reproduzir a direção do NAD⁺, que contém 72 átomos, a coordenada deste cofator é dada por $x = -7,68$, $y = -17,46$, $z = 31,95$ e raio = 15. Na figura 8, a imagem da melhor pose obtida com RMSD igual a 1,93 Å, está em conformidade com a literatura que define o limite aceitável para o desvio como um valor abaixo de 2 Å. Dessa forma, o procedimento de simulação computacional por *re-docking* é o parâmetro de validação que mostra a reprodução dos resultados experimentais obtidos para a estrutura cristalográfica da enzima ZmALDH1a, que é o molde para a construção da BoALDH.

Figura 14. *Re-docking* na enzima ZmALDH1a com valor igual a 1,93 Å. Em cinza a posição do ligante cristalográfico NAD⁺, em vermelho a melhor pose obtida na simulação.

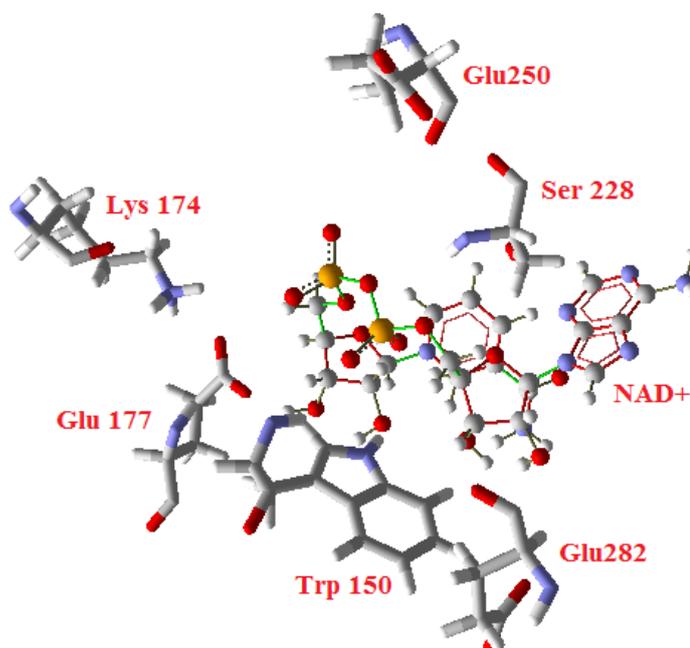


O *docking* do cofator NAD⁺ na enzima BoALDH utilizou a mesma coordenada do *re-docking* e a melhor pose gerada, correspondente aquela que possui o menor valor de energia potencial igual a -169,281 KJ/mol. Na tabela 2, são apresentadas as melhores pontuações de energia através dos valores de MolDock Score para o cofator. Na figura 9, é mostrado o *docking* do NAD⁺.

Tabela 2. Pontuações de energia MolDock Score para o cofator NAD⁺ na enzima BoALDH.

Ligante	MolDock Score (KJ/mol)
1. NAD ⁺	-169,281
2. NAD ⁺	-165,690
3. NAD ⁺	-163,406
4. NAD ⁺	-159,447
5. NAD ⁺	-135,172
6. NAD ⁺	-134,718
7. NAD ⁺	-133,686
8. NAD ⁺	-133,103
9. NAD ⁺	-132,532
10. NAD ⁺	-127,855

Figura 15. Docking da pose de menor energia do cofator NAD⁺ no sítio ativo da enzima BoALDH.



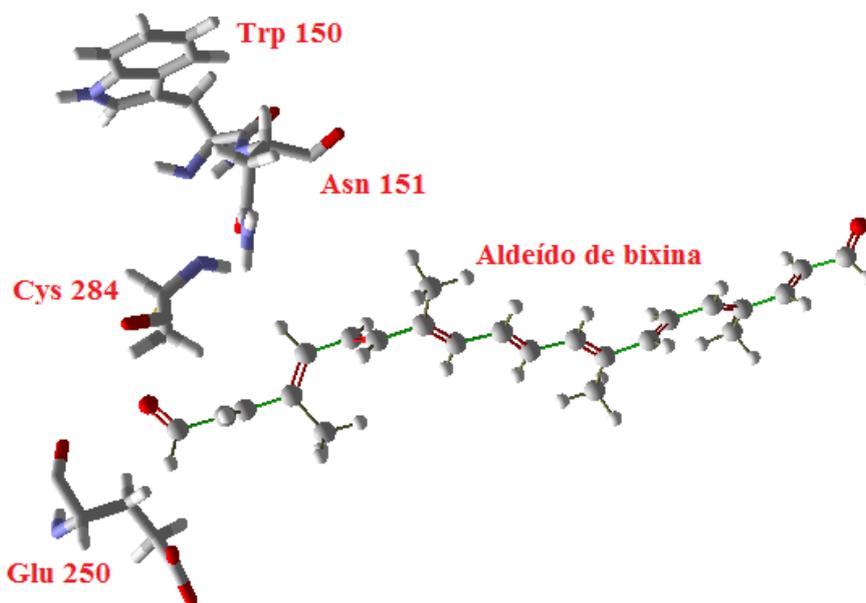
Na tabela 3, são apresentados os valores obtidos para a energia potencial de encaixe do *docking* do ligante aldeído de bixina na presença do cofator NAD⁺. O

melhor valor da pontuação de energia foi -153,500 KJ/mol. Na figura 10, é mostrada a imagem do ligante no domínio catalítico.

Tabela 3. Pontuações de energia MolDock Score para o ligante aldeído de bixina.

Ligante	MolDock Score
1. Aldeído de bixina	-153,500
2. Aldeído de bixina	-149,510
3. Aldeído de bixina	-148,527
4. Aldeído de bixina	-147,577
5. Aldeído de bixina	-144,839
6. Aldeído de bixina	-144,407
7. Aldeído de bixina	-143,748
8. Aldeído de bixina	-143,564
9. Aldeído de bixina	-140,804
10. Aldeído de bixina	-136,634

Figura 16. *Docking* do ligante aldeído de bixina no domínio catalítico da enzima BoALDH, na presença do cofator NAD⁺.

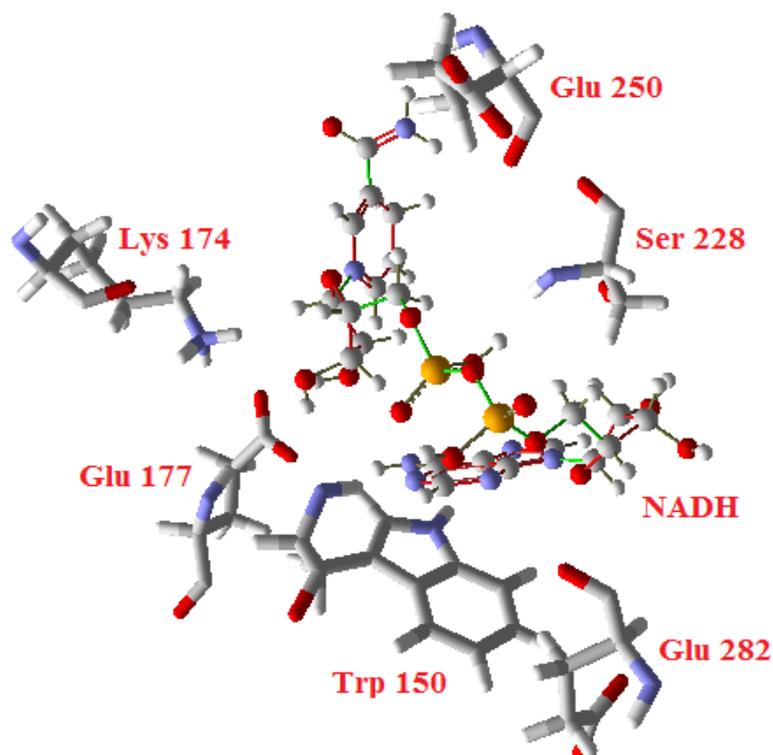


Na tabela 4 são mostrados os valores da energia potencial do encaixe entre o receptor e o cofator NADH, o melhor valor foi -174,612 KJ/mol. Na figura 16, é apresentado o *docking* da melhor pose do cofator.

Tabela 4. Pontuações de energia MolDock Score para o cofator NADH.

Ligante	MolDock Score
1. NADH	-174,612
2. NADH	-173,391
3. NADH	-171,982
4. NADH	-161,479
5. NADH	-160,796
6. NADH	-149,941
7. NADH	-148,699
8. NADH	-147,844
9. NADH	-144,727
10. NADH	-139,326

Figura 17. Docking da melhor pose do cofator NADH na enzima BoALDH.

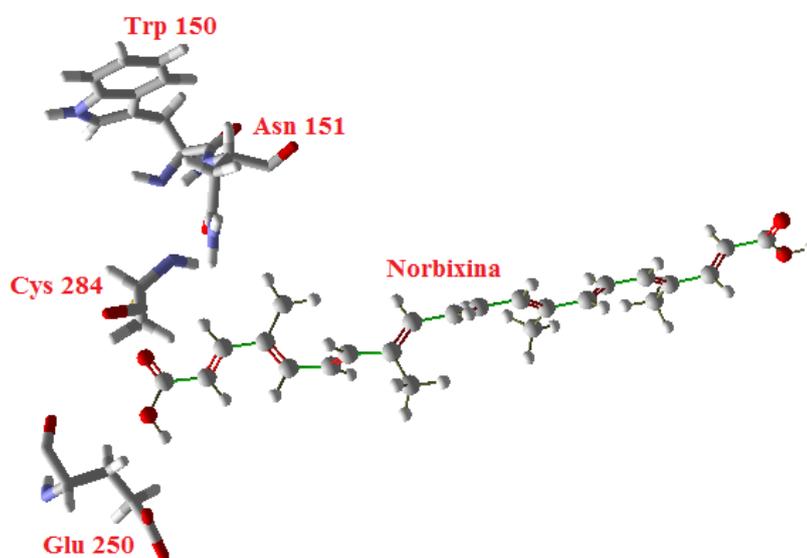


Na tabela 5, são apresentados os valores obtidos para a energia potencial de encaixe do *docking* do ligante norbixina na presença do cofator NADH. O melhor valor da pontuação de energia foi -148,855 KJ/mol. Na figura 12, é mostrada a imagem do ligante no domínio catalítico.

Tabela 5. Pontuações de energia MolDock Score para o ligante norbixina.

Ligante	MolDock Score
1. Norbixina	-148,855
2. Norbixina	-141,134
3. Norbixina	-137,332
4. Norbixina	-136,134
5. Norbixina	-130,027
6. Norbixina	-128,795
7. Norbixina	-126,633
8. Norbixina	-125,612
9. Norbixina	-115,630
10. Norbixina	-115,112

Figura 18. *Docking* do ligante norbixina no domínio catalítico da enzima BoALDH, na presença do cofator NADH.



O teste estatístico por análise de variância foi aplicado em dois níveis: presença e ausência do cofator NAD sob as duas formas NAD⁺ e NADH, e utilizou como parâmetro a pontuação de energia potencial do encaixe entre o receptor e os ligantes, dada pela função MolDock Score do software Molegro Virtual Docker.

O teste ANOVA verificou se a presença ou ausência do cofator NAD⁺ e NADH implicaria na atração ou repulsão do ligante aldeído de bixina e norbixina, respectivamente, para o sítio ativo. O teste partiu de duas hipóteses:

Hipótese nula (H₀): a energia potencial de encaixe do ligante é estatisticamente igual entre os dois níveis.

Rejeição da hipótese nula (H₁): a energia potencial de encaixe do ligante é estatisticamente diferente entre os dois níveis

O resultado, apresentado na tabela 6, mostra a escolha pela rejeição da hipótese nula (H₁), no caso do NAD⁺, o que indica que a presença do cofator favorece o encaixe do aldeído de bixina, pois a energia potencial é mais baixa, dando maior estabilidade para o ligante no sítio.

Tabela 6. Teste estatístico ANOVA para o cofator NAD⁺.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	278,849	278,849	10,528
Resíduo	16	423,759	26,4849	
Total		702,609	305,334	
Comparação entre F	F_{Calculado} > F_{Tabelado}			

O resultado do teste para o NADH, apresentado na tabela 7, mostra a escolha pela rejeição da hipótese nula (H₁), o que indica que a presença do cofator contribui para que a norbixina seja repelida do domínio catalítico, pois a energia de encaixe é mais elevada, reduzindo a estabilidade do ligante no sítio.

Tabela 7. Teste estatístico ANOVA para o cofator NADH.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	1016,894	1016,894	13,827
Resíduo	18	1323,751	73,541	
Total		2340,645	1090,436	
Comparação entre F	F_{Calculado} > F_{Tabelado}			

Capítulo 6

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi apresentada a estrutura tridimensional da enzima aldehyde dehydrogenase de *Bixa orellana* (BoALDH) obtida através da modelagem por homologia e relaxada por dinâmica molecular, e o estudo teórico dos ligantes aldeído de bixina e norbixina complexados à enzima através de *docking* molecular.

A modelagem por homologia molecular apresentou resultados satisfatórios quanto à predição do modelo tridimensional da proteína BoALDH, principalmente em relação à sua qualidade estereoquímica, e o desvio médio padrão em relação ao gerado no estudo cristalográfico, com RMSD igual a 0,701 Å. Além de apresentar os resíduos pertencentes ao sítio ativo bem conservados (Trp150, Asn151, Glu250 e Cys284), podendo ser utilizado para o estudo teórico das interações com os ligantes propostos.

A dinâmica molecular foi realizada utilizando o método de mecânica molecular. A análise global obtida através do gráfico de RMSD após 50 ns girou em torno de 2,385 Å, enquanto a análise local realizada através do gráfico de RMSF girou em torno de 1 Å. A proteína apresentou valores aceitáveis para garantir o relaxamento e a estabilidade da proteína com valores de desvio estrutural baixos, após o término da simulação.

A partir da estrutura obtida por homologia foi realizado o *docking* molecular dos ligantes aldeído de bixina e norbixina, os resultados confirmam a literatura a respeito do mecanismo catalítico enzimático da superfamília de enzimas ALDH10.

O sítio ativo da reação de conversão do aldeído de bixina em norbixina encontra-se entre os resíduos Trp150, Asn151, Glu250 e Cys284, confirmado pelos valores de energia potencial obtidos para o reagente com o valor de -144, 839 KJ/mol e produto -130, 027 KJ/mol. Estes valores indicam a estabilidade do aldeído de bixina no domínio catalítico, comportamento esperado no início da catalise enzimática, e a repulsão da norbixina do sítio, expressa pela menor estabilidade energética deste ligante quando comparado com a outra substância.

Outra contribuição deste estudo foi em relação a influência do cofator NAD sobre os inibidores. Os *dockings* realizados na ausência do NAD quando comparados aos *dockings* na presença do mesmo, através do teste estatístico de análise de variância (ANOVA) revelaram que o cofator favorece a energia de encaixe do inibidor aldeído de bixina. Em relação a norbixina o cofator contribui para que o inibidor seja repelido do domínio catalítico.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO NETO, J. Algumas aplicações de enzimas. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). *Biotechnology industrial – processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 2001.p. 405-412.

ALENCAR, N.A.N. Predição estrutural da enzima *O*-glcnacase humana e análise teórica do inibidor pugnac e derivados. 2011, 89 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. and LIPMAN, D. (1997) **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**. *Nucleic Acid Res.*, 25, 3389-3402.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 - carne e produtos cárneos. Portaria no 1.004, de 11 de dezembro de 1998.

ARAÚJO, V. F. de; PETRY, A. C.; ECHEVERRIA, R. M.; FERNANDES, E. C.; JR., F.P. Plantas da Amazônia para a produção cosmética. Brasília, jun. 2007.

BARBOSA FILHO, J.M.; SILVA FILHO, R.N.; LIRA, B.F.; et al. Teor de bixina em quatro variedades de Bixa orellana L. cultivadas na Paraíba. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 7/8, p. 41-47, 1998.

BARREIRO, E.J.; RODRIGUES, C.R.; ALBUQUERQUE, M.G.; SANT'ANNA; ALENCASTRO, R.B. de. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. *Química Nova*, v.20, n.1, 1997.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci*. 2005; 24:23-58.

BENKERT, P.; TOSATTO, S.C.E.; SCHOMBURG, D. **QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment**. *Proteins, Wiley-Liss, Inc.*, 2008; 71: 261-277.

BRITTON, G., in *Carotenoids*, G. Britton, S. Laaen-Jensen, H. Pfander, Eds. (Birkhäuser Verlag, Basel, 1998), vol.3, pp. 13-147.

Boletim ETENE – Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste. Ano 1 – nº06, jun. 2010.

BON, E. P. S.; PEREIRA JR, N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para a produção de enzimas. In: BOM, E.P.S; FERRARA, M.A.A.; CORVO, M.L. (Eds.). *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 95-122.

BOUVIER, Florence; DOGBO, Odette; CAMARA, Bilal. Biosynthesis of the Food and Cosmetic Plant Pigment Bixin (Annatto). *Science* 27 June 2003: Vol. 300 no. 5628 pp. 2089-2091.

Brocker C1, Vasiliou M, Carpenter S, Carpenter C, Zhang Y, Wang X, Kotchoni SO, Wood AJ, Kirch HH, Kopečný D, Nebert DW, Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta*. 2013 Jan;237(1):189-210.

BOWIE, J.U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, 1991. Jul 12; 253 (5016): 164-70).

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CORLETT, Francisco Marinaldo Fernandes; BARROS, Antonio Carlos Souza Albuquerque; VILLELA, Francisco Amaral. Qualidade fisiológica de sementes de urucum armazenadas em diferentes ambientes e embalagens. **Rev. bras. sementes**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 148-158, agosto 2007.

COSTA, C.K. Estudo fitoquímico de *Bixa orellana* L., Bixaceae e aplicação de seu óleo em formulação cosmética. Curitiba, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

DZIEZAK, J.D. Enzymes: catalyst for food processes. *Food Technology*, Chicago, v.45, n.1, p. 78-85, jan.1991.

EL TAYAR, N.; RUEY-SHIUAM, T.; TESYA, B.; CARUPT, P.A. Percutaneous of drugs: a quantitative structure-permeability relationship study. *Journal of Pharmaceutical Science*, Hoboken, v.80, n.8, p.744-749, ago. 1991.

EMATER. Análise técnica e econômica da atividade agropecuária do urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) no município de Paranacity, 2004. Disponível em: <http://www.emater.pr.gov.br/arquivos/File/Biblioteca_Virtual/Premio_Extensao_Rural/2_Premio_ER/06_An_Tec_Econ_Urucun.pdf> Acesso em: 09 jan. 2015.

EMATER. Cultura do Urucum – Informação Tecnológica, 2000. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/site_emater/Serv_Prod/Livraria/Cultura... Acesso em: 04 nov. 2015.

EUROPEAN COMMISSION. Collection of information on enzymes – final report. Contract no B4-3040/2000/278245/MAR/E2, 2002. Disponível em <http://europa.eu.int/comm/environment/dansub/enzymemerepcomplete.pdf>. Acesso em:

ESWAR, N.; MARTI-RENOM, M. A.; WEBB, B.; MADHUSUDHAN, M. S.; ERAMIAN, D.; SHEN, M.; PIEPER, U.; SALI, A. Comparative protein structure modeling with MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc., Supplement 15, 5.6.1-5.6.30, 2006.

FARIA, L.J.G.; ROCHA, S.C.S. Optimization of annatto (*Bixa orellana* L.) drying in fixed bed. **Braz. J. Chem. Eng.**, São Paulo, v. 17, n. 4-7, p. 483-496, Dec. 2000

FEDATTO, L. M. Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xilella fastidiosa* de citros e videira. 2004. 67 f. Dissertação (Mestrado em ecologia de Agrossistemas)- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FEITOSA, I.C. Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2009.

FERNANDES, AC.S.; ALMEIDA, C.A.; ALBANO, F.; LARANJA G.A.T.; FELZENSZWALB, I.; LAGE, C.L.S.; de SÁ, C.C.N.F.; MOURA, A.S.; KOVARY, K.; J. Nutr. Biochem. 2002, 13, 411; ARAÚJO, J.A.; Química de alimentos: teoria e prática, 2ª ed., Ed. UFV: Viçosa, 1999.

FERNANDES, M.L.M. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. 2007. 120 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FERREIRA, W.A.; FALESI, I. Teores de nutrientes e matéria seca na parte aérea e na raiz e percentagens de bixina de três tipos de urucueiros. In: Reunião Técnico-Científica Sobre Melhoramento Genético do Urucuzeiro, 1., 1991, Belém. Anais... Belém: EMBRAPA-CPATU, 1992.

FRANCO, C.F.O; SILVA, F.C.P.; FILHO, J.C.; NETO, M.B.; SÃO JOSÉ, A.R.; FONTINELLI, I.S.C. Urucuzeiro: Agronegócio de corantes naturais. João Pessoa, PB, 2002.

GALINDO-CUSPINEIRA, V; RANKIN, S.A. Bioautography and Chemical Characterization of Antimicrobial Compound(s) in Commercial Water-Soluble Annatto Extracts. Journal Agriculture Food Chemical. v. 53, p. 2524-2529:2005.

GARCIA, C. E. R., BOLOGNESI, V. J., DIAS, J. de F. G., MIGUEL, O. G., COSTA, C. K. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. Ciência Rural, Santa Maria, v.42, n.8, p. 1510-1517, ago., 2012.

GERHARTZ, W. Enzymes in industry: production and applications. New York: VHC Publishers, 1990.

GIULIANO, G. *et al.* To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. Trends in Biotechnology, v. 21, n. 12, p.513-516, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960856603000599>>. Acesso em: 27 ago. 2010. doi: 10.1016/j.tibtech.2003.10.001

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 5d. Oxford: Clarendon, 1999. 899p.

HÖLTJE, H.D.; FOLKERS, G. **Molecular modeling**: basic principles and applications. Weinheim: VCH, 1997. 194 p.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da extração vegetal e silvicultura, v.24, 2009. 45p. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatística/economia/pevs/2009/>. Acesso em: 21 ago. 2011. ISSN: 0103-8435.

IGNATIUS, N.F.J. Process control of solid-state fermentation: simultaneous control of temperature and moisture content. 2002. 192f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Wageningen Universiteit, Wageningen, 2002.

JENNINGS, D. H. Inorganic nutrition. In: BERRY, D. R. (Ed.) Physiology of industrial fungi. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1988. p. 76-96.

KANWAR, L.; GOGOI, B. K.; GOSWAMI, P. Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. Bioresource Technology, New York, v.84, p. 207-211, set. 2002.

KATO, O.R.; OLIVEIRA, V.P. de; FARIA, L.J.G. Plantas corantes da Amazônia In: FARIA, L. J. G.; COSTA, C.M.L. Tópicos especiais em tecnologia de produtos naturais. Belém: UFPA, 1998.

KOONIN EV, GALPERIN MY. Sequence - Evolution – Function: Computational Approaches in Comparative Genomics. Boston: Kluwer Academic; 2003. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20260/>

KOUTINAS, A. A.; WANG, R.; WEBB, C. Estimation of fungal growth in complex heterogeneous culture. Biochemical Engineering Journal, Amsterdam, v. 14, p. 93-100, maio 2003.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. São Paulo: Sarvier, 1995.

LI, C. Y.; CHENG, C.Y.; CHEN, T.L. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source. Enzyme and Microbial Technology, Atlanta, v. 29, p. 258-263, set. 2001.

LOPEZ-VALLEJO, F.; CAULFIELD, T.; MARTÍNEZ-MAYORGA, K.; GIULIANOTTI, M.A.; HOUGHTEN, R.A.; NEFZI, A.; MEDINA-FRANCO, J.L. Integrating virtual screening and combinatorial chemistry for accelerated drug discovery. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2011, 14, 475-487.

LIMA, L.R.P. *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. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v38n4/9706.pdf>. Acesso em: 2 nov. 2015.

LIMA, C.R. *et al.* In silico structural characterization of protein targets for drug development against *Trypanosoma cruzi*. J. Mol. Model.(2016) 22:244.

- LUTHY, R.; BOWIE, J.U.; EISENBARG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 1992, Mar 5; 356 (6364): 83-5.
- MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, London, v.38, n.5, p.715-721, dez. 2002.
- MERCADANTE, A. Z., STECK, A., PFANDER, H., *Phytochemistry* 46, 1379 (1997)
- MERCADANTE, A.Z.; TOCCHINI, L.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2001, 21, 310.
- MENG, X.Y.; ZHANG, H.X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug Discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 2011, 7, 146-157.
- MISSIHOUN, T.D.; SCHIMITZ, J.; KLUG, R.; KIRCH, H.H.; BARTELS, D. Betaine aldehyde dehydrogenase genes from Arabidopsis with different sub-cellular localization affect stress responses. *Planta*. 2011; 233:369-382. [PubMed: 21053011]
- MITSUYA, S.; YOKOTA, Y.; FUJIWARA, T.; MORI, N.; TAKABE, T. OsBADH1 is possibly involved in acetylaldehyde oxidation in rice plant peroxisomes. *FEBS Lett.* 2009; 583: 3625-3629. [PubMed: 19850038]
- MUSSALTO, S.I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.M.F. Enzimas – Poderosa ferramenta na indústria. *Ciência Hoje*, v. 41, n. 242.
- OCAMPO, R.A.S.; OROZCO, R. A. Aspectos agronômicos sobre el cultivo del achiote (*Bixa orellana* L.) In: Aspectos sobre el achiote y perspectivas para Costa Rica. Turrialba: CATIE, 1983. (Informe Técnico, 47).
- OLIVEIRA, V.P. Tratos culturais do Urucum. In: SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H. A cultura do urucum no Brasil. Vitória da Conquista, BA: UESB, 1990.
- OLITTA, A.F.L. Elaboração do projeto de irrigação. Brasília: ABEAS, 1988.
- PARIS, L.D. Produção de enzimas fúngicas pro fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional. 2008. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.
- PATEL, R.N. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology*, Atlanta, v.31, n.6, p.804-826, nov.2002.
- PEREZ-MILLER, S. J., and HURLEY, T. D. (2003) Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* 42,7100–7109.
- PICOLOTTO, D. R. N.; Theodoro, J. V. C.; DIAS A. R.; THEODORO, G. de F.; ALVES, C. Z. Germinação de sementes de urucum em função de métodos de superação de dormência e temperaturas. *Pesq. Agropec. Trop.*, Goiânia, v. 43, n. 3, p. 232-238, jul./set. 2013.

PIZARRO, A.V.L.; PARK, E.Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching Earth. *Process Biochemistry*, London, v.38, n.7, p.1077-1082, fev.2003.

PHADTARE, S. U.; DESHPANDE, V. V.; SRINIVASAN, M. C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enzyme and Microbial Technology*, Atlanta, v.15, n.1, p.72-76, jan.1993.

Plantas medicinais e suas aplicações na indústria. Manaus: FIEAM/DAMPI, 1995.

PRIEST, F.G. Extracellular enzymes. London: Van Nostrand Reinhold, 1984.

REBOUÇAS, T.N.H.; SÃO JOSÉ, A.R. A cultura do urucum: práticas de cultivo e comercialização. Vitória da Conquista, BA, 1996.

REMMERT, M., BIEGERT, A., HAUSER, A., SÖDING, J. HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment.

RODRÍGUEZ-ÁVILA, N.L., NARVÁEZ-ZAPATA, J.A., RAMIREZ-BENÍTEZ, J.E., AGUILAR-ESPINOSA, M.L., MADRID, R.R. Identification and expression. Pattern of a new carotenoid cleavage dioxygenase gene member from *Bixa orellana*. *Journal of Experimental Botany*, pp. 1-11.

RODRIGUES, A.M.; SANTANA, E.S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Sacchromyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 21, n.1, p.57-62, jan/abr. 2001.

RODRIGUES, A.D. Estudo da produção de polihidroxibutirato por *Cupriavidus necator* em fermentação no estado sólido. 2005. 86f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

RODRIGUEZ COUTO, S.; SAROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 22, n.3, p.211-219, fev. 2005.

ROSATI, C., DIRETTO, G., GIULIANO, G. **Biosynthesis and Engineering of Carotenoids and Apocarotenoids in Plants: State of the Art and Future Prospects.** *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* - Vol. 26, 151-174 (2009).

SANKARI, M., HEMACHANDRAN, H., ANANTHARAMAN, A., BABU, S., MADRID, R.R., FULZELE, G.P.D.C.D., SIVA, R. Identifying a carotenoid cleavage dioxygenase 4a gene and its efficient agrobacterium-mediated genetic transformation in *Bixa orellana*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, pp.1-18 (2016).

SANT'ANNA JUNIOR, G.L. Produção de enzimas microbianas. In: Lima, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). *Biotecnologia industrial – processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 351-362.

SATYANARAYANA, A. *et al.* Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.) Journal of Food Science Technology, v.40 n.2, p. 131-141, 2003. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4506.2006.00014.x/abstract>. Acesso em: 2 nov. 2015. Doi: 10.1111/j.1745-4506.2006.00014.x.

SANTOS FILHO, O.A. **Modelagem molecular da Di-hidrofolato redutase do plasmodium falciparum e estudo de seus inibidores pelo método QSAR-3D.** 2000.210 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2000.

SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. *Quim. Nova*, São Paulo, 26, n. 2, p. 253-259, mar/abr. **2003**.

SANTOS, D.T., SARROUH, B.F.; SANTOS, J.C.; PÉREZ, V.H.; SILVA, S.S. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em Biotecnologia. *Janus*, Lorena, n.4, p.164-183, 2º sem. 2006.

SANTOS, J.A.A.; SOUZA, M.F.A.M; SILVA, E.L.V.; AGUIAR JUNIOR, F.C.A. Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Ver. Bras. PI. Med.*, Campinas, v.16, n.3, supl. I, p. 637-643, 2014.

SENA, A. R.; KOBLITZ, M. G. B.; GÓES NETO, A.; UETANABARO, A.P.T. Seleção de fungos do Semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. *Sitientibus*, Feira de Santana, n.35, p. 91-98, jul/dez. 2006.

SHAHID-UL-ISLAM, RATHER, L.J, MOHAMMAD, F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications – A review. *Journal of Advanced Research* (2016) 7, 499–514.

SHU, C.H.; XU, C.J.; LIN, G.C. Purification and partial characterization of lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*, London, v. 41, p.734-738, mar. 2006.

SILVA, F.C.P. da; FRANCO, C.F.O. Urucuzeiro uma alternativa de agronegócio. João Pessoa: EMEPA-PB/Banco do Nordeste, 2000.

SILVA, J.H.V. da; ALBINO, L.F.T.; GODÓI, M.J. de S. Efeito do extrato de urucum na pigmentação da gema dos ovos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n. 5, 1435-1439p., 2000.

SILVA JUNIOR, C.T.S.; ASAD, L.B.M.O; OLIVEIRA, E.B. Antigenotoxic and antimutagenic potencial of na annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. *Genetic Molecular Research*. v.4, n.1, p.94-98, 2005.

SILVA, J. C. B. Novas Conquistas para o Setor. *Cosmetics & Toiletries* (edição em português), v. 18, n. 1, p. 20, jan./fev. 2006. Coluna Notícias da ABIHPEC.

SILVA, V.B da; SILVA, C.H.T.P. Modelagem molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.4, n.1, p.15-26, 2007.

SNA - Sociedade Nacional de Agricultura. Disponível em:< <http://sna.agr.br/demanda-por-corantes-naturais-aquece-mercado-brasileiro-de-urucum/>> Acesso em: 30 out. 2015.

SÖDING, J. **Protein homology detection by HMM-HMM comparison.** Bioinformatics, Tübingen, vol. 21 n. 7, 2005, p. 951-960.

SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J.S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.28, p. 116-124, dez. 2008.

SPIER, M.R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido. 2005. 157f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

THORNTON, J.M.; SWINDELLS, M.B. **Molecular structures in biology.** Oxford: Oxford University, 1993. 326 p.

TSUJI, H.; TSUTSUMI, N.; SASAKI, T.; HIRAI, A.; NAKAZONO, M. Organ-specific expressions and chromosomal locations of two mitochondrial aldehyde dehydrogenase genes from rice (*Oryza sativa* L.), ALDH2a and ALDH2b. Gene. 2003;305:195-204. [PubMed: 12609740]

Velišek J., Davidek J., Cejpek K. (2008): **Biosynthesis of food constituents: Natural pigments. Part 2—a review.** Czech J. Food Sci., **26**: 73–98.

VILAR, D. de A., VILAR, M.S. de A., MOURA, T.F.A.de L., RAFFIN, F.N., OLIVEIRA, M.R. de, FRANCO, C.F.de O., ATHAYDE-FILHO, P.F. de, DINIZ, M. de F.F.M., BARBOSA-FILHO, J.M. Traditional uses, chemical Constituents, and biological activities of *Bixa orellana* L.: a review, v.2014, 11 pages (2014).

WOICIECHOWSKI, A.L. Bioconversão de hidrolisado hemicelulósico de *Pinus taeda* obtido pelo processo de ácido L [+] láctico pelo fungo *Rhizopus oryzae*. 1997. 101 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

WYMORE, T., HEMPEL, J., CHO, S. S., MACKERELL, A. D., Jr., NICHOLAS, H. B., Jr., and DEERFIELD, D. W., 2nd (2004) Molecular recognition of aldehydes by aldehyde dehydrogenase and mechanism of nucleophile activation. Proteins **57**, 758–771.

ZADRAZIL, F.; PUNIA, A. K. Studies on the effect of particle size on solid state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using White-rot fungi. Bioresource Technology, New York, v.54, n.1, p.85-87, jan. 1995.

ZECHMEISTER, L. Cis-Trans Isomeric Carotenoids, Vitamins A, and Arilpolyenes (Springer-Verlag, Vienna, 1962).

Google Patents (1987). Disponível em:
<<https://patents.google.com/patent/US4699664A/en?q=norbixin> > Acesso em: <17 de dezembro de 2016>.

Google Patents (2003). Disponível em:
<<https://patents.google.com/patent/US20030039724A1/en?q=norbixin>> Acesso em:
<17 de dezembro de 2016>.