



## PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS COM ENZIMA COMERCIAL IMOBILIZADA EM SÍLICA DE POROSIDADE CONTROLADA

Carolina Pereira Francisco (PIBIC/FA), Graciette Matioli (Orientador), e-mail: carol\_pfrancisco@hotmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

**Área e subárea do conhecimento: Ciências da Saúde – Farmácia**

**Palavras-chave:** Imobilização, CGTase, ciclodextrinas.

**Resumo:** A enzima ciclodextrina-glicosiltransferase (CGTase) catalisa a degradação do amido, originando oligossacarídeos cíclicos constituídos de unidades de glicopiranosil. O fator limitante à utilização de ciclodextrinas (CDs) na indústria é o alto custo de produção. A técnica de uso da CGTase imobilizada tem sido proposta como uma alternativa que possibilita seu uso contínuo e repetido, diminuindo a perda enzimática e melhorando a estabilidade do biocatalisador. Neste trabalho, a CGTase comercial (Toruzyme®) foi imobilizada em sílica de porosidade controlada, utilizando octadecil-tri-metoxi-silano (OTMS) como agente modificador do suporte e aplicou-se a mesma na produção de CDs. Espera-se com esta pesquisa reduzir os custos de produção das CDs.

### **Introdução**

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos consistindo de seis ( $\alpha$ -CD), sete ( $\beta$ -CD), oito ( $\gamma$ -CD) unidades de glicose unidas por ligação  $\alpha$ -(1,4). Elas são produzidas a partir do amido com a enzima ciclodextrina-glicosiltransferase (CGTase) (DEL VALLE, 2004).

As aplicações das CDs na indústria farmacêutica são relevantes: aumento da estabilidade das substâncias ativas frente à hidrólise, à oxidação, ao calor e à luz, aumento da solubilidade e biodisponibilidade de fármacos, diminuição de efeitos adversos, redução da ação irritante de fármacos sobre a mucosa gástrica na administração oral e, também, podem ser utilizadas para mascarar sabores desagradáveis em formulações (DEL VALLE, 2004). A produção industrial de CDs tem sido principalmente conduzida em sistemas descontínuos, com a utilização da CGTase solubilizada no meio reacional, sendo que neste sistema é difícil o reaproveitamento enzimático





em diversas reações consecutivas. A técnica de uso da CGTase imobilizada tem sido proposto como uma alternativa que possibilita seu uso contínuo e repetido, evitando a solubilização e perda enzimática, e melhorando a estabilidade do biocatalisador (MATTE et al., 2012).

Diversas enzimas já foram imobilizadas em uma variedade de matrizes de sílica, utilizando diferentes métodos. Suportes de sílica são excelentes materiais para imobilização enzimática, devido a sua excelente biocompatibilidade, rigidez, estabilidade mecânica e operacional, alta estabilidade térmica, além de não possuir toxicidade, e mostrar uma resistência notável à degradação por microrganismos e solventes (MATTE et al., 2012). Neste trabalho imobilizou-se a CGTase comercial (Toruzyme®) em sílica de porosidade controlada, empregando octadeciltrimetoxisilano (OTMS) como agente modificador da sílica, e utilizou-se a enzima na produção de CDs.

### **Materiais e métodos**

#### *Preparo do suporte e imobilização da enzima*

Para a reação de modificação da sílica foi realizada a silanização de 10 g de sílica de porosidade controlada, adicionando 60 mL de etanol e 3 mL de OTMS em agitador orbital a 180 rpm, com temperatura controlada de 60 °C por 3h. Após, o material foi filtrado e lavado por duas vezes com 120 mL de etanol absoluto, seguido de 2 vezes com 120 ml de água ultra-pura e, então, levado a estufa para secagem por 24 h a 105 °C. Após a secagem o material foi acondicionado em dessecador para as etapas de imobilização.

A imobilização da CGTase comercial (Toruzyme®) foi feita adicionando, em erlenmeyer de 125 ml, uma solução de 10 mL de hexano e isopropanol (10:1) com 3 mL da enzima comercial e 5 g da sílica modificada com OTMS. O tubo foi agitado por 5 min a 120 rpm e em seguida, acondicionado dentro de um dessecador, onde foi feita a aplicação controlada de vácuo até total evaporação do solvente. Após a secagem, a sílica com a enzima imobilizada foi lavada com diferentes soluções, a fim de se obter a otimização do processo de lavagem, e armazenada em dessecador para que fossem realizados os testes posteriores.

#### *Otimização da lavagem*

A otimização do procedimento de lavagem da sílica contendo CGTase imobilizada foi feita lavando-se a sílica com hexano e água (teste 1), solução tampão citrato de sódio (teste 2) e ausência de lavagem após imobilização (teste 3), em três ciclos consecutivos de produção de beta-CD

#### *Otimização da concentração empregada de CGTase*



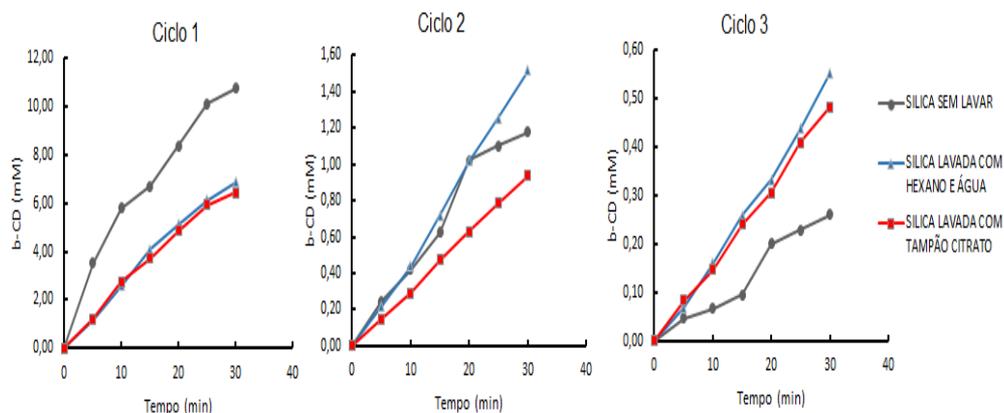


Foi realizado um experimento prévio para a atividade de produção das ciclodextrinas pela enzima imobilizada, utilizando diferentes concentrações da enzima (50, 100, 200, 400, 600 e 800  $\mu$ l enzima / g de sílica).

## Resultados e Discussão

### Otimização da lavagem

No primeiro ciclo de produção a sílica com a enzima imobilizada sem lavar apresentou uma produção de beta-CD maior do que quando lavada com solução de hexano/água e tampão citrato de sódio. Contudo, esse resultado era esperado e não poderia servir de comparação, visto que, sem a etapa de lavagem há muita enzima livre em torno da sílica e esta enzima acaba se perdendo na reação, fato que pode ser observado pelo ciclo 3, no qual a produção de beta-CD da sílica sem lavar foi inferior em relação aos outros testes. Nos ciclos 2 e 3, a enzima imobilizada lavada com a solução de hexano/água apresentou uma produção maior de beta-CD comparado à sílica lavada com tampão citrato de sódio e à sílica sem lavar, sendo este o método mais adequado, que será empregado para prosseguimento dos experimentos.

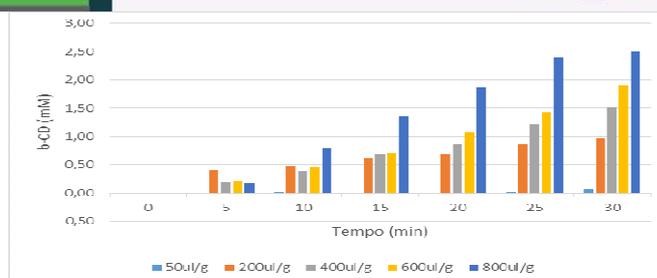


**Figura 1** – Produção de beta-CD a partir da enzima imobilizada em sílica testando a lavagem com hexano e água, solução tampão citrato de sódio e ausência de lavagem após imobilização, em três ciclo de produção.

### Otimização da concentração empregada de CGTase

Como pode ser observado na Figura 2, a produção de ciclodextrina cresce proporcionalmente em relação a concentração da enzima imobilizada até a concentração empregada.





**Figura 2:** Experimento prévio para produção de CDs por imobilização da enzima nas concentrações de 50, 100, 200, 400, 600 e 800 µl enzima / g de sílica.

Novos testes serão realizados aumentando a concentração de CGTase por grama de sílica.

### Conclusões

Os resultados indicam que há a produção de ciclodextrinas a partir da CGTase imobilizada em sílica de porosidade controlada em pelo menos três ciclos, sendo que a lavagem da sílica com hexano e água é a melhor técnica empregada, e a produção de ciclodextrina cresce proporcionalmente em relação a concentração da enzima utilizada na imobilização. Espera-se com essa pesquisa proporcionar o desenvolvimento de uma tecnologia de produção de ciclodextrinas mais economicamente viável, gerando uma característica diferenciada e atraente para indústrias que empregam ciclodextrinas.

### Agradecimentos

Agradeço à orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Graciete Matioli, à doutoranda Gabriela Gregolin Gimenez e aos colegas de laboratório, pela oportunidade e o auxílio na execução das atividades, e à Fundação Araucária pelo financiamento do projeto.

### Referências

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1033-1046, 2004.

MATTE, C. R.; NUNES, M. R.; BENVENUTTI, E. V.; SCHÖFFER, J. N.; AYUB, M. A. Z.; HERTZ, P. F. Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on silica microspheres via aminopropyltrimethoxysilane as a “spacer arm”. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 51– 56, 2012.

