

PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS UTILIZANDO CGTase COMERCIAL IMOBILIZADA POR ANCORAGEM EM SÍLICA DE POROSIDADE CONTROLADA

Richard Marllon Silva (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Graciette Matioli (Orientador), e-mail: gmatioli@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Farmacêuticas, PR.

Área: Biotecnologia **Subárea: 90400003 Biotecnologia**

Palavras-chave: imobilização, CGTase, ancoragem

Resumo:

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos constituídos de seis, sete, oito ou mais unidades glicopiranosil, produzidas a partir do amido com a enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). O fator limitante à utilização de CDs na indústria é o alto custo de produção. A técnica de imobilização enzimática possibilita uso contínuo e repetido de enzimas, melhorando a estabilidade do biocatalisador. O objetivo deste trabalho foi imobilizar CGTase comercial (Toruzyme® 3.0L) em sílica de porosidade controlada por método de ancoragem em superfície e aplicá-la na produção de CDs. O método mostrou-se muito eficiente na imobilização da CGTase comercial, pois nas condições otimizadas foi possível imobilizar 89,63% de CGTase, que manteve boa performance. A técnica de imobilização avaliada se mostrou simples e com suporte a base de sílica de preço acessível.

Introdução

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos constituídos de seis (α -CD), sete (β -CD), oito (γ -CD) ou mais unidades glicopiranosil unidas por ligação α -(1,4), produzidas a partir do amido com a enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) (DEL VALLE, 2004). As CDs possuem o exterior hidrofílico e uma cavidade interna hidrofóbica, sendo capazes de formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de moléculas apolares, e devido a esta característica, elas são utilizadas diversas áreas (MATIOLI, MORAES e ZANIN, 2000).

A produção industrial de CDs tem sido conduzida em sistemas descontínuos com a utilização da CGTase solubilizada no meio reacional, sendo que neste sistema é difícil o seu reaproveitamento. Uma alternativa é a técnica de imobilização de enzimas, que possibilita seu uso contínuo e repetido, evitando a solubilização e a perda, e melhorando a estabilidade do biocatalisador (MATTE et al., 2012).

Muitas enzimas já foram imobilizadas em uma variedade de matrizes de sílica utilizando diferentes métodos. As sílicas são suportes mesoporosos que oferecem propriedades especiais como suportes de imobilização, tais

como elevada área superficial, estabilidade térmica e mecânica, facilidade de manuseamento, capacidade de suportar altas taxas de fluxo em reatores contínuos, não toxicidade e não são atacadas por micro-organismos e solventes orgânicos (HUDSON, COONEY e MAGNER, 2008).

O objetivo deste trabalho foi imobilizar a CGTase comercial (Toruzyme® 3.0L) em sílica de porosidade controlada por método de ancoragem em superfície utilizando Octadeciltrimetoxisilano (OTMS) como agente espaçador entre a enzima e o suporte, otimizando alguns parâmetros do processo de imobilização enzimática, para aplicá-lo na produção de CDs.

Materiais e métodos

Imobilização de CGTase em sílica por método de ancoragem

O suporte de imobilização da CGTase foi preparado por duas etapas, a primeira etapa consistiu na modificação química da sílica e a segunda na imobilização enzimática. A modificação química foi realizada por reação de silanização de 10 g de sílica de porosidade controlada com 60 mL de etanol absoluto e 3 mL de OTMS, a 60 °C, 180 rpm, 3 h.

A etapa de imobilização foi realizada adicionando 5 g da sílica modificada em Erlenmeyer contendo 3 mL da enzima livre e 10 mL de hexano a temperatura ambiente. A suspensão foi agitada a 100 rpm pelo período de 5 min. Em seguida foi aplicado vácuo controlado até total evaporação do solvente. Após imobilização, a sílica foi lavada com hexano seguido de água ultrapura, seca a temperatura ambiente e armazenada em dessecador.

Otimização da imobilização enzimática

A otimização da imobilização enzimática foi conduzida variando os seguintes parâmetros: solvente utilizado na lavagem da sílica após imobilização (hexano seguido de água; solução tampão citrato de sódio 10 mM pH 6.0); solvente utilizado na imobilização (hexano puro; hexano e isopropanol 90:10; hexano e isopropanol 50:50); concentração de CGTase adicionada na etapa de imobilização (50; 100; 200; 300; 600 µL CGTase / g sílica) e tempo de contato da enzima com a sílica e o solvente antes da evaporação (5; 60; 180 min).

A determinação da melhor condição de imobilização de cada parâmetro avaliado foi realizada pelo método das velocidades iniciais utilizando 50 mL de solução de maltodextrina 15% (p/V) diluída em 10% (V/V) de tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0, a 65 °C, sob agitação magnética constante. Alíquotas de 1 mL foram coletadas em intervalos de 5 min e inativadas. A reação durou 30 min, e foram realizados três ciclos operacionais consecutivos para cada análise. As alíquotas obtidas foram utilizadas para determinação espectrofotométrica de β-CD.

Resultados e Discussão

O método de imobilização a vácuo mostrou-se muito eficiente. Nas condições de imobilização não otimizadas foi possível obter 6,85 mM de β-

CD em 30 min de reação. A maior vantagem desse método sobre os demais foi a necessidade de um tempo reduzido para completar todo o processo de imobilização enzimática, que neste estudo ocorreu em $12,0 \pm 0,5$ min. Este método é rápido, ocorre a baixa temperatura e causa a remoção constante do solvente do meio de imobilização.

A otimização do solvente empregado na lavagem da sílica após imobilização enzimática mostrou que a lavagem com hexano seguido de água foi a mais adequada, pois no primeiro e terceiro ciclo não houve diferença significativa na produção de β -CD, porém, no segundo ciclo, a solução de lavagem hexano seguido de água se sobressaiu, produzindo 1,07 mM a mais de β -CD.

A otimização do solvente empregado na imobilização enzimática levou a maior eficácia do hexano puro no ciclo 1, com maior produção de β -CD, fazendo com que este se mostrasse melhor que os demais solventes, mesmo com queda no rendimento nos ciclos 2 e 3 (Fig. 1). A produção elevada no ciclo 1 foi mais significativa que a diferença nos demais ciclos.

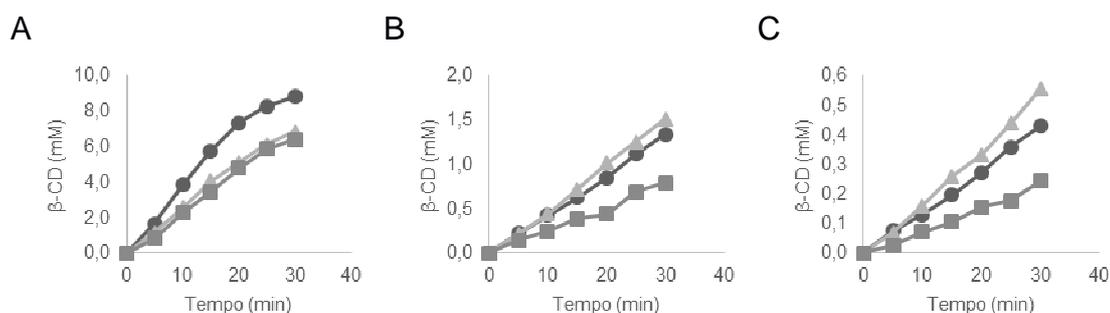


Figura 1 - Otimização do solvente de imobilização enzimática empregando hexano puro (●), hexano e isopropanol 9:1 (▲) e hexano e isopropanol 1:1 (■) nos ciclos 1 (A), 2 (B) e 3 (C).

A otimização da concentração levou em consideração o coeficiente de determinação (R^2). De acordo com a Figura 2, as concentrações de 50 a 300 μ L de CGTase/g de sílica apresentaram R^2 acima de 0,99 no ciclo 1, porém a produção de β -CD foi significativamente maior nas concentrações de 200 e 300 μ L de CGTase/g de sílica. Optou-se pela utilização de 200 μ L de CGTase/g de sílica, considerando o custo elevado da enzima.

A otimização do tempo de contato da enzima com a sílica e o solvente produziu 5,11, 4,36 e 3,29 mM de β -CD nos tempos 5, 60 e 180 min, respectivamente, sendo que o tempo de 5 min, além de ser mais rápido, também foi mais eficiente.

Nas condições otimizadas foi possível imobilizar 89,63% de CGTase em sílica de porosidade controlada. Desta forma, a concentração enzimática em solução foi de 0,18% (V/V), que resultou em 4,31 mM de β -CD produzida em 30 min de reação.

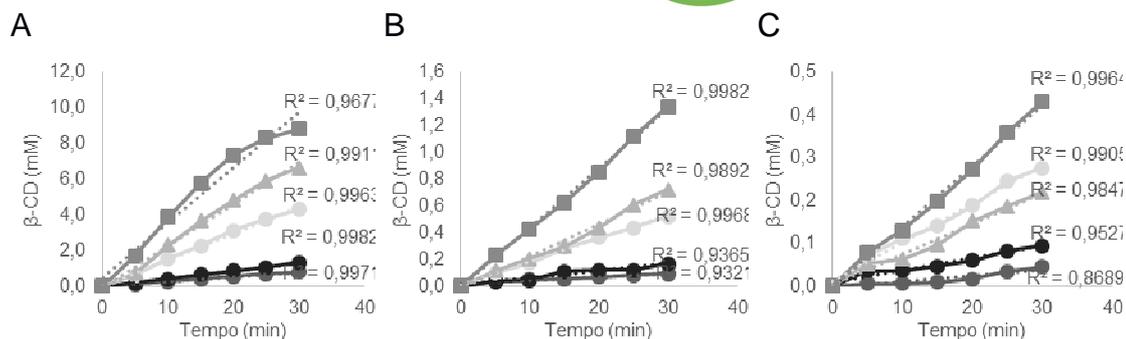


Figura 2 - Otimização da concentração de CGTase empregada na imobilização enzimática: 50 (●), 100 (●), 200 (●), 300 (▲) e 600 (■) μ l de CGTase/g de sílica nos ciclos 1 (A), 2 (B) e 3 (C).

Conclusões

Os resultados mostraram que o método de imobilização por ancoragem é simples e eficaz, além da vantagem de apresentar tempo reduzido para completar a imobilização e capacidade de obter biocatalisador pronto para uso após o processo de imobilização. Considerando que o suporte a base de sílica tem custo reduzido e a enzima imobilizada tem boa performance, sugere-se que o novo biocatalisador heterólogo descrito possa ser utilizado na produção de CDs em processos contínuos ou por batelada.

Agradecimentos

Agradeço à orientadora Graciete Matioli, à doutoranda Gabriela Gregolin e à Fundação Araucária, pelo incentivo e oportunidade.

Referências

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

HUDSON, S.; COONEY, J.; MAGNER, E. Proteins in mesoporous silicates. **Angewandte Chemie**, v. 47, p. 8582–8594, 2008.

MATIOLI, G.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. **Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais**. Maringá: Eduem, 2000. 124 p.

MATTE, C. R. et al. Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on sílica microspheres via aminopropyltrimethoxysilane as a “spacer arm”. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 51–56, 2012.