

## PRODUÇÃO SELETIVA DE BETA-CICLODEXTRINA UTILIZANDO O COMPLEXANTE ÁCIDO 3-FENILPROPIÔNICO

Aline Satomi Noce (PIBIC/FA), Graciette Matioli, gracietteuem@gmail.com

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

**Ciências da Saúde – Farmácia.**

**Palavras-chave:** beta-ciclodextrina, ácido 3-fenilpropênico, Toruzyme.

### Resumo

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, formados por meio da reação de transglicosilação intramolecular promovida pela enzima ciclomaltodextrina glucanotransferase (CGTase). As CDs mais comumente produzidas são  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, compostas por 6, 7 e 8 moléculas de glicose, respectivamente. Elas são capazes de formar complexos de inclusão com diversas moléculas hóspedes, aumentando a estabilidade e/ou solubilidade das mesmas. Devido à importância das CDs e às várias aplicações industriais, este trabalho teve por objetivo utilizar a enzima Toruzyme<sup>®</sup>, CGTase comercial, com maior rendimento e seletividade, por meio da adição do agente complexante ácido 3-fenilpropênico, em presença de etanol. Em reator encamisado, a 65 °C/24h, realizou-se dois ensaios sem e com o agente complexante, sendo coletadas amostras em tempos pré-determinados. Ao final, observou-se um aumento na produção de  $\beta$ -CD em 15,5% com a presença do agente complexante. Portanto, o agente complexante foi adequado e beneficiou a produção de  $\beta$ -CD de forma apreciável, podendo levar a redução dos custos de produção desta CD.

### Introdução

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, não redutores, formadas por unidades de glicose, unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, formando três principais tipos de CDs, compostas por 6, 7 e 8 moléculas de glicose denominadas  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD, respectivamente. As CDs apresentam uma estrutura tridimensional que se assemelha a um tronco de cone, no qual a região externa é hidrofílica, e a interna lipofílica. Quando substâncias são complexadas no interior da cavidade das CDs, promovem uma alteração nas propriedades físicas e químicas da molécula hóspede, tais como aumento da solubilidade, redução da volatilidade, aumento da estabilidade, além da capacidade de mascarar sabores desagradáveis (BIWER, 2002; DEL VALLE, 2004).

A produção das CDs é realizada a partir de amido ou derivados deste, usando a enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). Esta enzima é extracelular, monomérica e produzida por uma variedade de microrganismos. Em geral, as CGTases produzem uma mistura de CDs e, portanto, existe a necessidade de métodos de purificação complexos, por conta da alta solubilidade em água da  $\alpha$ - e da  $\gamma$ -CD, o que dificulta o procedimento de separação, tornando a produção destas moléculas para aplicação industrial de alto custo. Uma maneira de reduzir o custo de produção das CDs é tentar tornar a produção da enzima seletiva para a molécula desejada e aumentar o seu rendimento, ao adicionar agentes complexantes orgânicos. Em escala industrial, tem sido comumente usado para produzir CDs (BIWER, 2002; CHALLA 2015)

Portanto, devido à importância das CDs, as suas diversas aplicações industriais e a necessidade de facilitar o processo de purificação das CDs, este trabalho teve por objetivo verificar a ação do ácido 3-fenilpropionico, em presença de etanol, no aumento da seletividade e rendimento da produção de  $\beta$ -CD pela CGTase comercial Toruzyme.

## Materiais e métodos

Enzima Toruzyme<sup>®</sup> 3,0L, lote ACN 0020, lote ACN 00220 (cedida pela Novozyme, Bento Gonçalves, RS), amido de mandioca (comercial), fenolftaleína, etanol, carbonato de sódio, ácido clorídrico, ácido 3-fenilpropionico, acetato de sódio, entre outros. Todos os reagentes foram de grau analítico. Os principais equipamentos utilizados foram agitador magnético, reatores de vidro encamisados, pHmetro, balanças analítica e semi-analítica, banho termostático, centrífuga, espectrofotômetro, deionizador, entre outros.

### *Condições de trabalho para a produção de CDs pela enzima comercial Toruzyme<sup>®</sup>*

A produção de beta-CD sem o agente complexante utilizou 0,1% da enzima Toruzyme<sup>®</sup>, contendo 15% de amido de mandioca como substrato, 10% de etanol e água tamponada com 10% do tampão citrato pH 6,0 (10mM). O outro ensaio de produção de CDs, além dos reagentes citados anteriormente foi adicionado ao meio de reação 0,5959 g de ácido 3-fenilpropionico, e o pH da solução teve que ser monitorado durante a produção e, quando necessário corrigido com NaOH 1N.

Ambas as produções foram feitas em um reator encamisado de 50 mL, a 65 °C, com agitação magnética, hermeticamente fechados, as quais foram monitoradas por 24 h. Amostras de 1 mL foram coletadas de cada meio reacional em tempos específicos (0, 3, 6, 12 e 24h).

Para determinar a concentração de  $\beta$ -CD nas amostras, construiu-se a curva padrão a partir de soluções de concentrações conhecidas de  $\beta$ -CD, na faixa de 0 a 1 mmol/L, e as leituras foram feitas em espectrofotômetro a 550 nm. Desta forma, ao plotar a curva padrão, a equação não-linear foi encontrada utilizando os dados de absorvância em função das concentrações conhecidas pelo método Quasi-Newton, no programa Statística®.

A presença de etanol foi importante para melhorar a atuação da enzima na produção de CDs. Segundo Fenelon e colaboradores (2015), o etanol promove uma redução da atividade de água no sítio ativo da enzima, impedindo que esta realize reações hidrolíticas e reações reversas, evitando, desta forma, a decomposição de CDs recém formadas.

## Resultados e Discussão

Com os dados de absorvância em função da concentração conhecida de beta-ciclodextrina, e utilizando a Teoria da Complexação, a constante de equilíbrio ( $K_{\beta\text{-CD}}$ ) foi estimada pelo método Quasi-Newton, no programa Statística®. A Equação 1 foi obtida e o valor da constante foi de 20101,68.

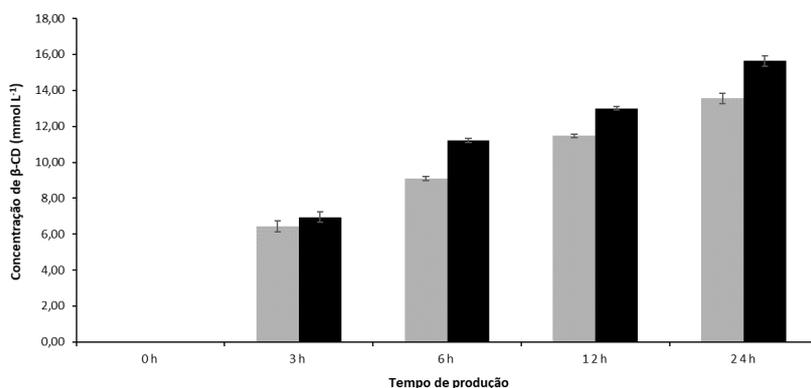
$$C_{\beta\text{-CD}} = 0,3 \times \left(1 - \frac{ABS}{ABS_0}\right) \times \left(1 + 0,9949 \frac{ABS_0}{ABS}\right) \quad [1]$$

As 5 amostras coletadas em tempos diferentes das produções sem e com o agente complexante foram lidas no espectrofotômetro, a 550 nm, e utilizando a Equação 1, suas respectivas concentrações de  $\beta$ -CD foram obtidas. Os resultados são apresentados na Tabela 1, a seguir.

**Tabela 1** – Concentrações de  $\beta$ -CD obtidas em diferentes tempos sem agente complexante (somente com 10% de etanol) e com agente complexante (10% de etanol e 1,17% de ácido 3-fenilpropiónico)

Tempo (h)	Concentração de beta-CD (mM)	
	Sem agente complexante com 10% etanol	Com 10% etanol e 1,17% de ácido 3-fenilpropiónico
0	0	0
3	6,4388	6,9525
6	9,0805	11,2194
12	11,4717	13,0044
24	13,5514	15,6496

Para comparação dos a dados apresentados na Tabela 1, um gráfico de concentração de CD em função do tempo de produção do mesmo foi plotado, e apresentado na Figura 1. É possível observar que em todos os tempos ocorreu uma maior produção de  $\beta$ -CD quando do uso do agente complexante, sendo que em 24h de ensaio o uso do agente complexante levou a uma produção de  $\beta$ -CD 15,48% maior em relação ao ensaio sem agente complexante.



**Figura 1** – Produções de  $\beta$ -CD em 24h (■) sem agente complexante e com 10% de etanol e, (■) com 10% de etanol e 1,17% de ácido 3-fenilpropionico

## Conclusões

Conclui-se que a produção com a presença do agente complexante foi consideravelmente maior quando comparada com a produção sem o mesmo. Este aumento na produção pode ser explicado pela  $\beta$ -CD estar complexada com o ácido 3-fenilprpiônico, o que impede sua destruição por reações reversíveis que podem ocorrer durante a produção; conseqüentemente, uma maior produção do oligossacarídeo cíclico ocorreu. Portanto, esta pesquisa comprovou que a formação de um complexo estável de CD com um agente complexante adequado favorece o rendimento da produção de CDs de forma considerável, o que resulta na redução dos custos de produção das CDs.

## Agradecimentos

À profa. Graciette Matioli pela orientação e incentivo. À Fundação Araucária pela concessão da bolsa e a UEM pela oportunidade de aprendizado.

## Referências

- BIWER, A.; ANTRANIKIAN, G.; HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, n. 6, p. 609-617, 2002.
- CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R.K. Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 2, p.329-357, 2005.
- DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1033-1046, 2004.
- FENELON, V. C.; AGUIAR, M. F. A.; MIYOSHI, J. H., MARTINEZ, C. O.; MATIOLI, G. Ultrafiltration system for cyclodextrin production in repetitive batches by CGTase from *Bacillus firmus* strain 37. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, p. 1291–1301, 2015.