

**USO DE AGENTES COMPLEXANTES PARA O AUMENTO NA PRODUÇÃO DIRECIONADA DE CICLODEXTRINAS POR ENZIMA COMERCIAL TORUZYME®****Maria F. A. Aguiar<sup>a</sup>, Vanderson C. Felon<sup>a</sup>, Juliane H. Miyoshi<sup>a</sup>, Nathalia M. Valério<sup>a</sup>, Camila S. Mangolim<sup>b</sup> e Graciete Matioli<sup>a,\*</sup>**<sup>a</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil<sup>b</sup>Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

Recebido em 12/04/2023; aceito em 01/08/2023; publicado na web 12/09/2023

USE OF COMPLEXING AGENTS FOR INCREASED TARGETED PRODUCTION OF CYCLODEXTRINS BY COMMERCIAL ENZYME TORUZYME®. Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides, products of the intramolecular transglycosylation reaction promoted by the enzyme cyclomaltodextrin glucanotransferase (CGTase). The most commonly produced CDs are  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD and  $\gamma$ -CD, composed of 6, 7 and 8 glucose molecules, respectively. They form non-covalent inclusion complexes with several molecules, increasing their stability and/or solubility. Due to the importance of CDs and the various industrial applications, this work aimed to use the commercial enzyme Toruzyme® to obtain CDs and direct its production to  $\alpha$ -CD or  $\beta$ -CD through the use of ethanol and complexing agents in the reaction medium. The reaction medium added with ethanol and cyclohexanecarboxylic acid directed the production to  $\beta$ -CD, reaching 47.09 mg mL<sup>-1</sup> of this molecule. The production medium containing ethanol and stearic acid proved to be more advantageous for the production of  $\alpha$ -CD and, after 48 h of reaction, the production of  $\alpha$ -CD reached 19.57 mg mL<sup>-1</sup>, a value six times greater than that of amount of  $\beta$ -CD produced. With this study it was possible to prove that with the use of ethanol and complexing agents in the reaction medium it is possible to direct the production of a certain CD and, thus, make different CGTases economically viable for industrial use.

Keywords: complexing agents; cyclohexanecarboxylic acid; stearic acid.

**INTRODUÇÃO**

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, formadas por unidades de glicopiranoses, unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4. Existem três principais tipos de moléculas de CD compostas por 6, 7 e 8 moléculas de glicose denominadas  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, respectivamente. Estas moléculas diferenciam-se no tamanho, diâmetro e volume da cavidade do anel, e na solubilidade em água.<sup>1-3</sup>

A estrutura tridimensional das CDs se assemelha a um cone truncado, no qual as hidroxilas das unidades de glicose ficam orientadas para a parte exterior do cone, enquanto os carbonos e oxigênios etéreos das unidades de glicose ficam voltados para cavidade do mesmo.<sup>3</sup> Este formato ocorre pelo fato de na porção estreita externa do cone se localizarem as hidroxilas primárias, enquanto na porção larga externa se encontram as hidroxilas secundárias.<sup>4</sup> Em solução aquosa, o interior das CDs é preenchido por moléculas de água em uma interação polar-apolar energeticamente desfavorável, as quais são substituídas facilmente por moléculas menos polares do que a água.<sup>5</sup> Portanto, ocorre a substituição das moléculas de água que possuem uma entalpia elevada, por moléculas apolares de entalpia menor, promovendo um aumento de entropia e redução da energia total do sistema.<sup>4</sup>

Desta forma, as CDs são capazes de interagir no interior de sua cavidade hidrofóbica com uma grande variedade de moléculas hóspedes para formar complexos de inclusão não covalentes.<sup>2</sup> O que promove uma alteração nas propriedades físicas e químicas da molécula hospedada no interior da CD.<sup>4</sup> Pode ocorrer o aumento da solubilidade em água da molécula hóspede, a redução da volatilidade, o aumento da estabilidade, além da capacidade de mascarar sabores desagradáveis. Esta e outras propriedades, bem como a possibilidade

de serem usadas para liberação controlada de fármacos, fazem as CDs terem aplicações no campo farmacêutico, alimentício, têxtil, entre outros.<sup>3-7</sup>

No campo farmacêutico, as CDs podem ser usadas para reduzir a cristalinidade do fármaco por complexação ou dispersão sólida com elas, o que leva a uma melhora na solubilidade do fármaco.<sup>8</sup> As CDs promovem uma redução da irritação causada por fármacos, por aumentar a solubilidade do fármaco e, assim, aumentar a eficácia e potência deste, reduzir a entrada indesejada do medicamento em células de tecidos não direcionados, reduzindo os efeitos colaterais do medicamento sem perda drástica dos seus benefícios terapêuticos.<sup>2,9,10</sup>

Assim, devido a ampla utilização das CDs e as vantagens relacionadas a sua utilização, principalmente no campo farmacêutico, um número considerável de artigos, livros e capítulos de livros são publicados sobre estas moléculas,<sup>11-13</sup> o que tem favorecido as indústrias farmacêuticas a terem mais referências bibliográficas, facilitando o uso das CDs nas formulações de fármacos.

A produção das CDs é realizada a partir de amido ou derivados deste, usando a enzima ciclomaltodextrina glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19).<sup>6,14</sup> As CGTases são extracelulares, monoméricas e produzidas por uma variedade de microrganismos, como por exemplo, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Clostridium* spp., *Thermoanaerobacter* spp., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, *Anaerobranca gottschalkii*, *Paenibacillus macerans* (antigamente denominado como *Bacillus macerans*), e algumas espécies de *Bacillus*.<sup>6,14,15</sup> As CGTases possuem importância industrial por serem a única classe de enzimas e capazes de converter amido e outros substratos relacionados em CDs por meio de reações de transglicosilação intramolecular (ciclização). Estas enzimas também promovem reações de transglicosilação intermolecular (acoplamento e desproporcionamento) e em um menor grau, reações de hidrólise.<sup>7</sup>

\*e-mail: gmatioli@uem.br

As CGTases em geral produzem uma mistura de CDs, incluindo principalmente  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, e são classificadas em  $\alpha$ -CGTase,  $\beta$ -CGTase e  $\gamma$ -CGTase, de acordo com a principal CD produzida pela enzima.<sup>14</sup> A enzima comercial Toruzyme®, por exemplo, inicialmente produz níveis semelhantes de  $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD, entretanto, se a reação for por um tempo prolongado, a  $\beta$ -CD se torna o produto principal. Sendo assim, a quantidade e o tipo de CD formada dependem da origem da CGTase, do substrato, do agente complexante e das condições de reação.<sup>15,16</sup>

Devido fato de as CGTases, em geral, produzirem uma mistura de CDs, há a necessidade de métodos de separação e purificação das CDs. A alta solubilidade em água da  $\alpha$ -CD e da  $\gamma$ -CD torna o procedimento de separação destas moléculas de alto custo para aplicação industrial.<sup>15,17,18</sup> Um exemplo que demonstra como a separação das moléculas encarece o produto final é o fato do amido de mandioca, matéria-prima para produção de CDs, custar no mercado na faixa de US\$4,75/kg,<sup>19</sup> enquanto que, segundo a empresa Cyclolab Co., Ltd. (Budapeste, Hungria), o quilograma da  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CDs para uso industrial alcança valores de US\$470,00;<sup>20</sup> 80,00<sup>21</sup> e 690,00,<sup>22</sup> respectivamente.

Uma forma de diminuir o custo de produção das CDs é tentar tornar a produção da enzima seletiva para a molécula desejada e aumentar o seu rendimento.<sup>14</sup> Desde o século XX sabe-se que isso é possível ao adicionar agentes complexantes, como solventes orgânicos. Quando, por exemplo, um agente complexante seletivo para  $\alpha$ -CD é adicionado no meio reacional, ele forma um complexo de inclusão insolúvel ou altamente estável com a  $\alpha$ -CD produzida no meio, ocorrendo uma redução do efeito de inibição do produto sobre a reação enzimática e, conseqüentemente, a enzima ao invés de diminuir a produção de  $\alpha$ -CD e aumentar a produção de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, ela passa a produzir ainda mais  $\alpha$ -CD. Considerando que este processo tem sido usado para produzir CDs numa escala industrial, há grande interesse em encontrar agentes complexantes seletivos e eficazes.<sup>14,17</sup>

Alguns autores demonstraram que ao adicionar glicirrizina em um meio reacional contendo a CGTase de *Bacillus firmus* cepa 37, houve um aumento da produção de  $\gamma$ -CD pela enzima. Como a glicirrizina tem a propriedade de se complexar 100% com a  $\gamma$ -CD, a seletividade para a produção de  $\gamma$ -CD aumentou cerca de 60%.<sup>23</sup> Outro estudo comprovou que o uso de etanol em meio reacional contendo CGTase comercial Toruzyme®, aumentou a produção de  $\beta$ -CD, estrutura representada na Figura 1, e o rendimento de  $\alpha$ -CD quase triplicou.<sup>24</sup> Também já foi comprovado que a adição de acetonitrila, etanol e tetraidrofurano favoreceram a produção de  $\alpha$ -CD pela CGTase de *Thermoanaerobacter* sp.<sup>25</sup>

Para a escolha do agente complexante adequado é necessário que este tenha uma alta seletividade para um único tipo de CD. Por exemplo, os ácidos graxos 3-fenilpropionico e ciclohexanocarboxílico, ambos também representados na Figura 1, possuem uma seletividade de 100% para  $\beta$ -CD sendo, portanto, ótimos candidatos para aumentar a produção desta CD.<sup>26</sup>

Estes mesmos autores demonstraram que os ácidos graxos ácido mirístico e o ácido esteárico (Figura 1) possuem 100% de seletividade para  $\alpha$ -CD.

Devido à importância das CDs e as diversas aplicações industriais e, considerando que o direcionamento na reação enzimática da enzima para a produção de CDs pode ser favorável para reduzir os custos e facilitar sua aplicação, este trabalho teve por objetivo verificar a possibilidade de aumentar a seletividade e o rendimento da produção de  $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD pela enzima comercial Toruzyme®, utilizando o ácido 3-fenilpropionico e o ácido ciclohexanocarboxílico no meio reacional para produção de  $\beta$ -CD, bem como ácido mirístico e ácido esteárico para produção de  $\alpha$ -CD.

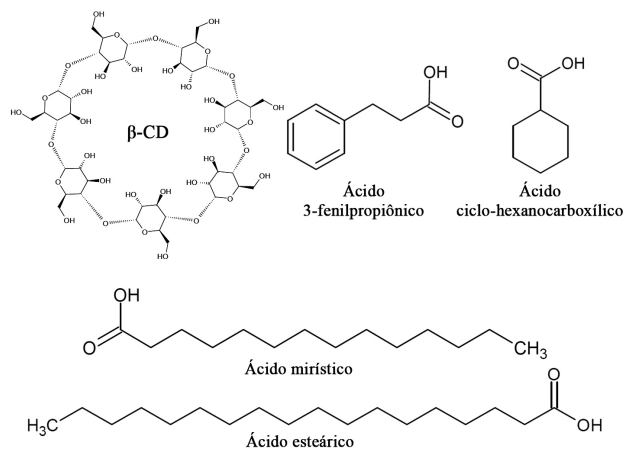


Figura 1. Estruturas químicas da  $\beta$ -CD, do ácido 3-fenilpropionico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido mirístico, e ácido esteárico

## PARTE EXPERIMENTAL

### Produção de CDs pela enzima Toruzyme® na presença e na ausência de etanol 10%

O método da produção de CDs pela enzima comercial foi baseado em uma metodologia já publicada.<sup>24</sup> A produção se deu em um reator de vidro encamisado contendo um meio de produção com 15% (p v<sup>-1</sup>) de amido de mandioca comercial, juntamente com 0,1% da enzima Toruzyme®, e a reação aconteceu a 65 °C em agitação constante. Nos tempos 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144 e 168 h de produção uma alíquota de 1 mL foi retirada do meio reacional e transferida para um tubo de 10 mL. Junto a esta amostra, foi adicionado 1 mL de HCl 20 mmol L<sup>-1</sup> e deixado em ebulição durante 10 min, com a finalidade de se inativar a enzima. Em seguida, foram adicionados 2 mL de água tamponada (água deionizada com 10% de tampão citrato 10 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,0), e este material foi centrifugado a 9500 xg, a 40 °C durante 20 min. O sobrenadante foi separado para quantificar as CDs.

Outro ensaio foi realizado conforme descrito acima, contudo, o meio de produção continha 10% de etanol 99,5%.

### Influência dos agentes complexantes de $\beta$ -CD na produção de CDs

Este ensaio foi feito de forma semelhante ao citado anteriormente, porém com a adição dos agentes complexantes ácido ciclohexanocarboxílico e ácido 3-fenilpropionico no meio reacional, e foi baseado em trabalhos já publicados.<sup>23,26</sup> Para cada agente complexante de  $\beta$ -CD foi realizado um ensaio de produção que se deu em reator encamisado, com temperatura controlada por um banho, contendo o meio reacional com etanol 10%, o agente complexante e a enzima. Nos tempos 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144 e 168 h de reação, foi retirada uma alíquota de 1,0 mL, a enzima foi desativada com ebulição durante 10 min na presença de HCl 20 mmol L<sup>-1</sup>. Esta mistura foi diluída na proporção 1:6 e centrifugada a 9500 xg, 40 °C durante 20 min. O sobrenadante foi separado para quantificar a  $\beta$ -CD produzida, pelo método espectrofotométrico.

A concentração necessária de agente complexante foi determinada usando como base alguns estudos científicos já publicados.<sup>27,28</sup> A partir destes estudos, determinou-se a concentração necessária de agente complexante suficiente para dar suporte à enzima durante uma produção de CDs em 168 h. Os cálculos partiram de ensaios previamente realizados de produção de  $\beta$ -CD, na presença de etanol 10%, por 24 h, os quais resultaram num valor de 13,032 mmol L<sup>-1</sup>.

A concentração necessária dos agentes complexantes para dar suporte a enzima durante a produção foi feita baseando-se na Equação 1:

$$C_{Ag} = C\beta\text{-CD}_{24h} \times (d - 1) \quad (1)$$

onde,  $C_{Ag}$  é a concentração molar de agente que deve ser adicionado no meio de produção;  $C\beta\text{-CD}_{24h}$  é a concentração molar de  $\beta\text{-CD}$  produzida em 24 h na presença de etanol 10%, no caso, 13,032 mmol L<sup>-1</sup>; e  $d$  é o número de dias que a enzima permanece em produção, sendo neste estudo considerado 7 dias.

Utilizando o valor encontrado de  $C_{Ag}$  e conhecendo a massa molar dos agentes complexantes de  $\beta\text{-CD}$ , foram realizados cálculos para verificar a concentração dos mesmos, em p v<sup>-1</sup>, que deveria ser usada. Como a massa molar do ácido 3-fenilpropiónico é de 150,2 g mol<sup>-1</sup>, a concentração usada do ácido 3-fenilpropiónico foi determinada em 1,17% (p v<sup>-1</sup>). Já a concentração de ácido ciclohexanocarboxílico foi de 1,0% (p v<sup>-1</sup>).

### Influência dos agentes complexantes de $\alpha\text{-CD}$ na produção de CDs

Este ensaio seguiu a metodologia do item anterior, contudo os agentes complexantes utilizados foram o ácido esteárico, de pureza 48,6%, e o ácido mirístico, de pureza 98%. As concentrações destes agentes foram determinadas após a utilização da Equação 1, sendo que com o resultado dos cálculos foi usado 1,89% (p v<sup>-1</sup>) de ácido mirístico e 2,36% (p v<sup>-1</sup>) de ácido esteárico.

### Descomplexação do ácido esteárico e ácido mirístico da $\alpha\text{-CD}$

A separação dos agentes complexantes da  $\alpha\text{-CD}$  foi realizada separando alíquotas de 2 mL do meio de produção contendo estes agentes, com seu posterior congelamento e liofilização. Após a liofilização, o pó foi ressuspenso com etanol P.A. na proporção 2:5. Em seguida, as alíquotas foram centrifugadas a 15 °C, 4000 xg durante 5 min. Por fim, os sobrenadantes contendo os ácidos graxos foram descartados e aos precipitados, que continham amido e as CDs produzidas, foram adicionados 2 mL de água deionizada. Em seguida, estes materiais foram centrifugados a 9500 xg, a 40 °C durante 20 min. Os sobrenadantes, contendo as CDs produzidas, foram congelados até o momento de ser feita a quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### Determinação espectrofotométrica de $\beta\text{-CD}$

A concentração de  $\beta\text{-CD}$  foi medida pela descoloração de uma solução reagente contendo fenoltaleína em meio básico e, esta descoloração aconteceu após a complexação da fenoltaleína com a  $\beta\text{-CD}$  presente na amostra. A solução foi lida em 550 nm. A quantificação foi realizada de acordo com a Teoria da Complexação,<sup>29</sup> que leva em consideração a constante de equilíbrio ( $K\beta\text{-CD}$ ), a concentração da solução de fenoltaleína ( $a = 0,05$  mmol L<sup>-1</sup>), a absorbância das amostras (ABS) e de uma solução isenta de  $\beta\text{-CD}$  (ABS<sub>0</sub>). A equação para calcular a concentração de  $\beta\text{-CD}$  está demonstrada a seguir, na Equação 2:

$$C\beta\text{-CD} = 600 \times a \left( 1 - \frac{ABS}{ABS_0} \right) \times \left[ 1 + \frac{ABS_0}{(K\beta\text{-CD} \times a \times ABS)} \right] \quad (2)$$

Após realizado os cálculos conforme a Equação 2, os valores encontrados foram multiplicados por 1,135 para converter a concentração de  $\beta\text{-CD}$  em mmol L<sup>-1</sup> para mg mL<sup>-1</sup>.

### Determinação de CDs por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As concentrações de  $\alpha\text{-CD}$ ,  $\beta\text{-CD}$  e  $\gamma\text{-CD}$  produzidas nos diferentes ensaios foram determinadas por CLAE. Utilizou-se o cromatógrafo líquido Waters 2695 (Varian) equipado com detector de índice de refração Waters 2414, coluna aminopropilsilano (SGE) com tamanho de partícula 5  $\mu\text{m}$ , comprimento 25 cm e diâmetro interno 4,6 mm. O desenvolvimento se deu por eluição isocrática, utilizando como fase móvel uma solução de acetonitrila e água (70:30) e um fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup> à temperatura ambiente (25 °C). Os padrões e as amostras foram filtrados em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Curvas analíticas foram construídas para  $\alpha\text{-CD}$ ,  $\beta\text{-CD}$  e  $\gamma\text{-CD}$  em diferentes faixas de concentração. Os resultados da área dos picos de cada CD em função da concentração no padrão foram ajustados por regressão linear.

### Análises estatísticas

Os resultados de rendimento de CDs foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

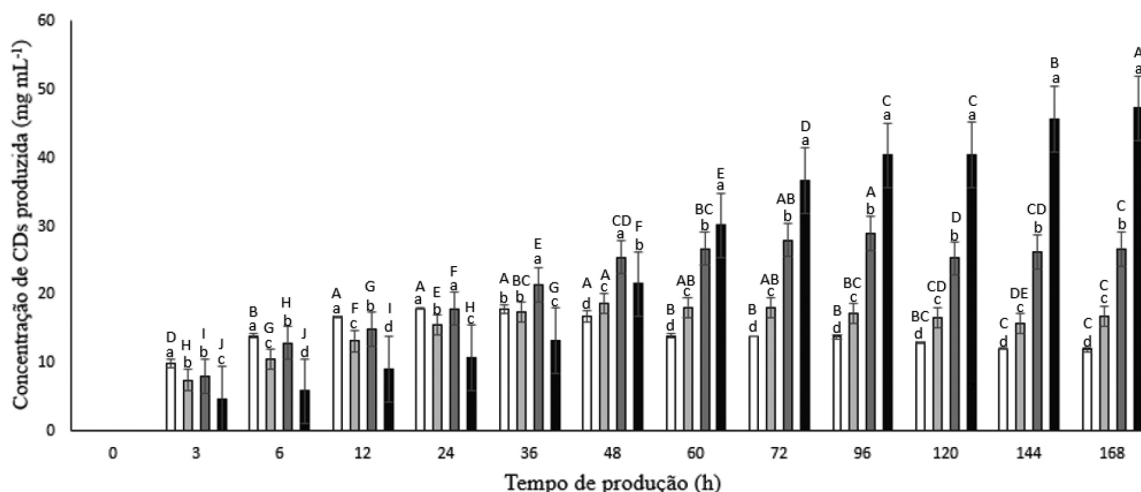
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Influência dos agentes complexantes na produção de $\beta\text{-CD}$

A Figura 2 apresenta o gráfico da produção de  $\beta\text{-CD}$  a 65 °C, 15% de amido de mandioca, 0,1% de enzima comercial Toruzyme®, 168 h de reação.

Em 24 h a produção de  $\beta\text{-CD}$  sem a presença de etanol resultou em 17,77 mg mL<sup>-1</sup>, enquanto na presença deste solvente a produção teve uma queda de 13,5%, resultando numa concentração de 15,38 mg mL<sup>-1</sup>. Entretanto, depois de 36 h de produção, o perfil de produção de  $\beta\text{-CD}$  inverteu, sendo que o pico da produção desta CD na presença do solvente ocorreu no tempo 48 h, com uma concentração de 18,49 mg mL<sup>-1</sup>, 4,1% maior do que o pico de produção de  $\beta\text{-CD}$  na ausência de etanol. A concentração de  $\beta\text{-CD}$  produzida no meio contendo etanol se manteve relativamente estável a partir de 96 h de produção, permanecendo maior que a concentração desta CD quando produzida em um meio isento de etanol.

A partir 36 h de produção de CDs o meio reacional contendo 10% de etanol e o ácido 3-fenilpropiónico produziu mais  $\beta\text{-CD}$  do que os meios sem agentes complexantes, tendo seu pico de produção no tempo 96 h, e a produção desta CD alcançou o valor de 28,73 mg mL<sup>-1</sup>. Neste mesmo tempo, o meio contendo somente a enzima e o substrato produziu 13,64 mg mL<sup>-1</sup> de  $\beta\text{-CD}$ , ou seja, uma produção de  $\beta\text{-CD}$  52,5% menor quando comparada com a produção contendo o etanol e o ácido 3-fenilpropiónico. Apesar do meio reacional contendo etanol 10% e o ácido ciclohexanocarboxílico ter produzido menos  $\beta\text{-CD}$  do que os demais nas primeiras 36 h, quando a reação alcançou o tempo 60 h, sua produção ultrapassou a de todos os outros ensaios, tendo seu pico de concentração de  $\beta\text{-CD}$  no tempo de 168 h, no qual a concentração desta molécula chegou a 47,09 mg mL<sup>-1</sup>, enquanto o meio que continha apenas a enzima e o substrato atingiu uma produção de 11,79 mg mL<sup>-1</sup> de  $\beta\text{-CD}$ , ou seja, a produção de  $\beta\text{-CD}$  no meio com o agente complexante foi aproximadamente quatro vezes maior do que o meio que continha somente a enzima e o substrato. Este resultado foi mais vantajoso do que o encontrado na literatura para os agentes complexantes dimetilsulfóxido e álcool *tert*-butílico, os quais aumentaram em 16% e 19%, respectivamente, a produção de  $\beta\text{-CD}$  produzida pela CGTase de *Thermoanaerobacter* sp.<sup>25</sup>



**Figura 2.** Produção de  $\beta$ -CD a 65 °C, 15% de amido de mandioca, 0,1% de enzima comercial Toruzyme®, 168 h de reação, na ausência de etanol (□), na presença de etanol 10% (■), na presença de etanol 10% e do ácido 3-fenilpropionico (■), na presença de etanol 10% e ácido ciclo-hexanocarboxilico (■). As letras de a até d correspondem ao teste de Tukey realizado analisando a variação do meio em cada tempo de produção; já as letras de A até G, correspondem ao teste de Tukey realizado analisando a variação do tempo em cada meio de produção

A baixa influência do ácido ciclo-hexanocarboxílico no início da reação, quando comparada com a influência do ácido 3-fenilpropionico, pode ter sido devido aquele agente complexante ser menos solúvel que este. Estudos demonstraram que a força da ligação entre o ácido ciclo-hexanocarboxílico e CD é maior do que a força de ligação entre esta molécula e o ácido 3-fenilpropionico,<sup>27</sup> o que justifica, nesta pesquisa, o fato da presença do ácido ciclo-hexanocarboxílico resultar em maior produção de  $\beta$ -CD.

#### Produção de CDs pela Toruzyme® na ausência e na presença de etanol 10% - determinação por CLAE

A Figura 3 apresenta gráficos da produção de CDs durante 168 h, na presença e ausência de etanol. As determinações foram feitas por meio de CLAE.

A Figura 3(a) mostra que na ausência de etanol a CD produzida predominantemente foi a  $\beta$ -CD, sendo que a concentração desta teve o seu pico em 24 h de produção, atingindo 13,71 mg mL<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD. Com 72 h de ensaio a produção reduziu para metade (6,97 mg mL<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD) e se manteve praticamente estável até o final do ensaio. Neste mesmo meio de produção, a concentração da  $\alpha$ -CD teve o seu pico em 24 h de reação, com uma produção de 7,31 mg mL<sup>-1</sup>, o qual se manteve praticamente constante até o final do ensaio. No pico de produção de  $\beta$ -CD no tempo de 24 h, esta foi aproximadamente duas vezes maior que a produção de  $\alpha$ -CD. Portanto, a enzima comercial neste meio de produção, produziu mais  $\beta$ -CD, principalmente nas 72 h iniciais de ensaio.

Entretanto, ao avaliar a Figura 3(b), é evidenciado que o perfil de produção da enzima foi alterado na presença de etanol 10%, pois na presença deste solvente a CD que passou a ser produzida predominantemente foi a  $\alpha$ -CD, a qual teve o seu pico de concentração em 12 h de reação (23,03 mg mL<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -CD). A produção de  $\beta$ -CD também foi maior em relação ao meio na ausência de etanol, entretanto, o ápice da sua concentração se deu depois de 48 h de reação com uma produção de 16,84 mg mL<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD. É importante ressaltar que, no tempo em que houve o pico de concentração da  $\alpha$ -CD, a concentração de  $\beta$ -CD era de 8,13 mg mL<sup>-1</sup>, ou seja, no meio reacional havia quase 3 vezes mais  $\alpha$ -CD do que  $\beta$ -CD. Este aumento da produção de  $\alpha$ -CD sem um acréscimo significativo da produção de  $\beta$ -CD está de acordo com o que já foi demonstrado por alguns autores.<sup>24</sup> Os dados apresentados por estes autores demonstraram que

a presença de etanol 10%, após 12 h de reação, levou a um aumento na concentração de  $\alpha$ -CD de cerca de 20 mg mL<sup>-1</sup>, sendo que a concentração de  $\beta$ -CD aumentou menos que 5 mg mL<sup>-1</sup>.

Analisando as Figura 3(a) e 3(b) identifica-se um aumento de CD total no meio contendo etanol 10% em relação ao meio na ausência deste solvente. Autores já mostraram que 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.<sup>30</sup>

Em ambos os ensaios (Figura 3(a) e 3(b)) foi verificado que a produção da  $\gamma$ -CD foi insignificante.

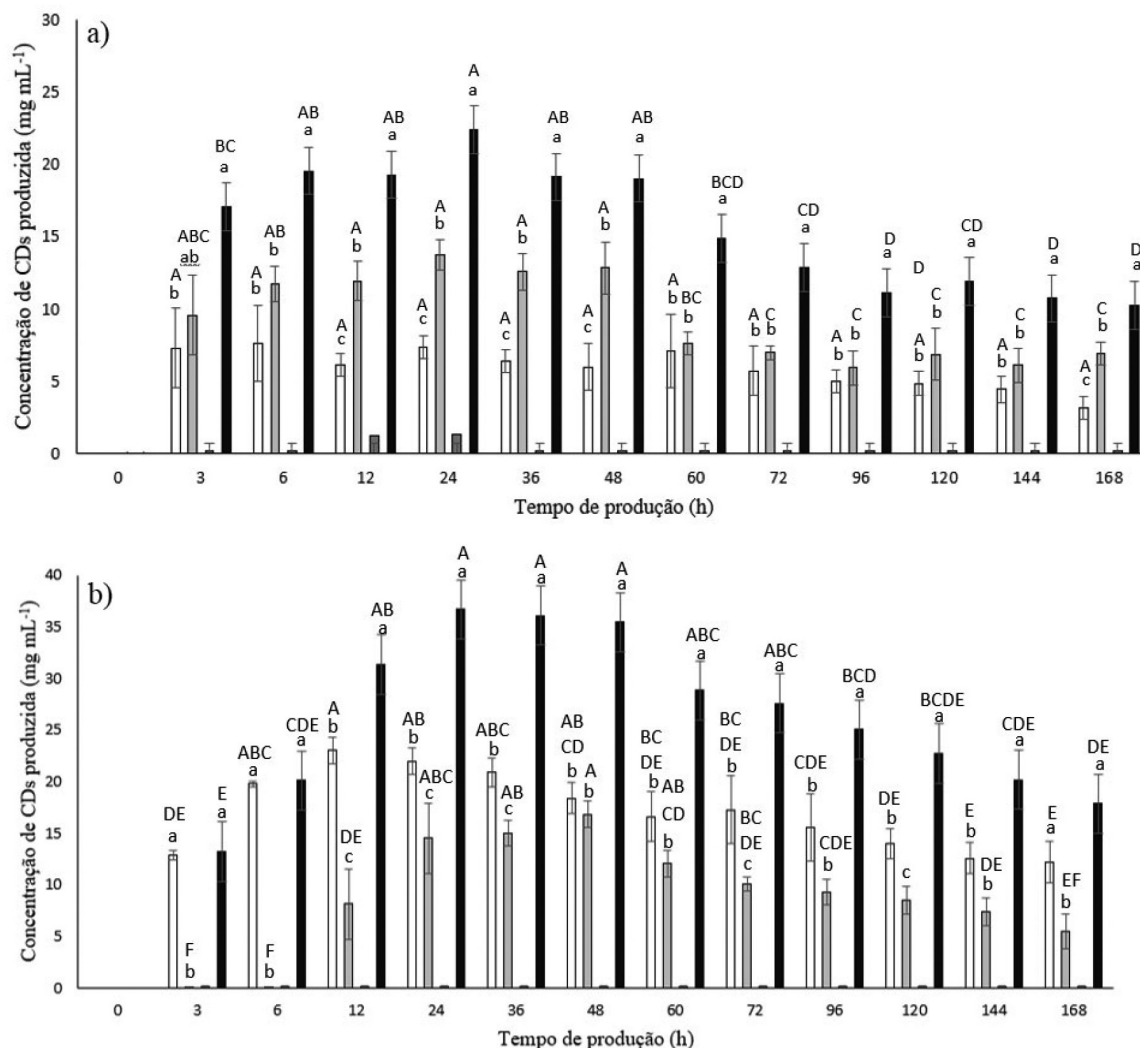
#### Produção de CDs pela Toruzyme® na presença dos agentes complexantes para $\alpha$ -CD - determinação por CLAE

A Figura 4 apresenta um gráfico de produção de CDs durante 168 h na presença do ácido mirístico e na presença do ácido esteárico.

A Figura 4(a) demonstra que a CD que teve a concentração mais predominante no meio foi a  $\alpha$ -CD, sendo que a sua concentração chegou ao máximo em 48 h de ensaio, atingindo o valor de 20,93 mg mL<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -CD. A concentração de  $\beta$ -CD chegou ao seu ápice em 24 h de reação, alcançando o valor de 10,72 mg mL<sup>-1</sup>, e após este tempo a concentração de  $\beta$ -CD deu uma queda estatisticamente pouco significativa, comprovado pelo teste de Tukey, e permaneceu consideravelmente estável durante todo o restante do ensaio. Apesar do meio de produção contendo ácido mirístico precisar do dobro do tempo de reação para alcançar o ápice da concentração de  $\alpha$ -CD em relação ao tempo necessário para chegar à concentração máxima de  $\beta$ -CD, a quantidade de  $\alpha$ -CD neste tempo foi 95% maior do que a quantidade de  $\beta$ -CD no seu ápice. É importante ressaltar que no momento em que houve o pico da concentração de  $\alpha$ -CD, a concentração de  $\beta$ -CD era de 8,96 mg mL<sup>-1</sup>, ou seja, no meio reacional tinha 2,3 vezes mais  $\alpha$ -CD do que  $\beta$ -CD.

Na Figura 4(b) é notável a produção de  $\alpha$ -CD, a qual na presença do ácido esteárico, foi muito maior que as demais, sendo que a sua concentração chegou ao ápice no tempo 48 h (19,57 mg mL<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -CD), assim como no meio contendo o ácido mirístico. Também é importante evidenciar que no momento do pico de produção de  $\alpha$ -CD, o meio reacional apresentava 3,31 mg mL<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD, ou seja, a quantidade de  $\alpha$ -CD em 48 h foi quase 6 vezes maior do que a quantidade de  $\beta$ -CD no mesmo tempo, uma diferença mais significativa do ocorrido para os outros meios de produção.





**Figura 3.** Produção de  $\alpha$ -CD (□),  $\beta$ -CD (■),  $\gamma$ -CD (■) e total de CDs (■) a 65 °C, 15% de amido de mandioca, 0,1% de enzima comercial Toruzyme®, 168 h de reação na ausência de etanol (a) e na presença de etanol 10% (b). As letras de a até c correspondem ao teste de Tukey realizado analisando a variação do meio de produção em cada tempo de produção; já as letras de A até F, correspondem ao teste de Tukey realizado analisando a variação do tempo de produção em cada meio de produção

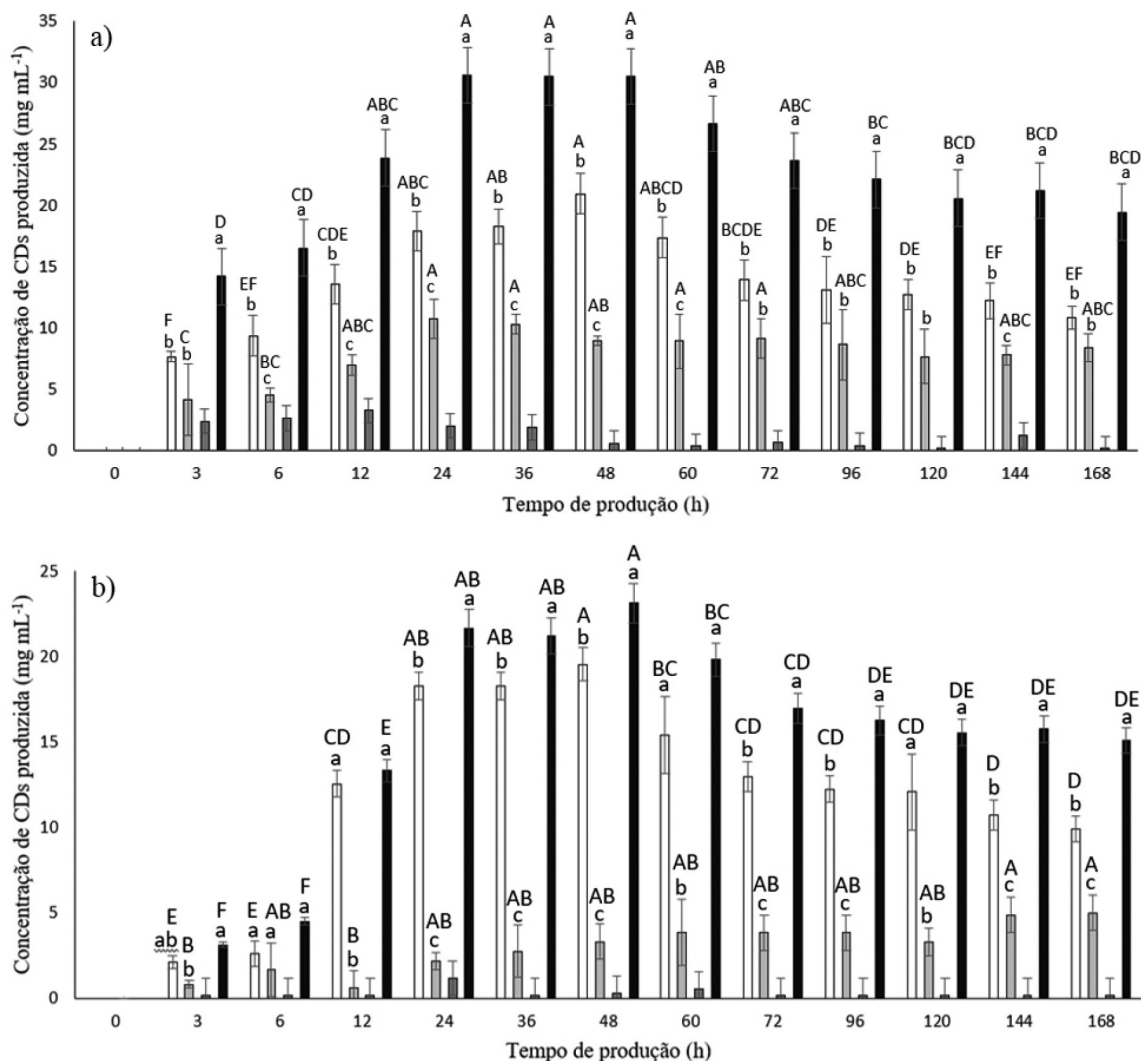
Na literatura foi relatado que o uso do 1-decanol, o qual é o agente complexante mais utilizado na produção de  $\alpha$ -CD pela  $\alpha$ -CGTase de *K. pneumoniae* M5a1, levou a um aumento de 50% do rendimento.<sup>17</sup>

Também na Figura 4(b) foi observado que o perfil de produção do  $\beta$ -CD durante todo o período de 168 h foi crescente, diferente do que aconteceu no meio que continha o ácido mirístico (Figura 4(a)). Neste experimento, a concentração de  $\beta$ -CD no tempo final de ensaio (168 h) chegou ao valor de 5,00 mg mL<sup>-1</sup>, enquanto que na presença do ácido mirístico foi de 8,40 mg mL<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD, ou seja, a produção de  $\beta$ -CD foi mais vantajosa na presença do ácido mirístico do que na presença do ácido esteárico. Uma última análise a se fazer em relação à Figura 4(b) é o fato de que a concentração de  $\gamma$ -CD permaneceu, durante todo o tempo, insignificante.

A maior produção de  $\alpha$ -CD e em menor tempo (12 h) foi verificada no meio com etanol 10% e sem a presença de agentes complexantes. Isto ocorreu quando o ensaio foi realizado em 168 h nos diferentes meios de produção e com 0,1% da enzima comercial Toruzyme®, entretanto, os meios reacionais que continham os agentes complexantes e etanol apresentaram maior produção de  $\alpha$ -CD ao longo das 168 h, do que aquele em que havia a ausência de etanol (Figura 1S, material suplementar).

Apesar da concentração de  $\alpha$ -CD nos meios contendo agentes complexantes ser menor do que a concentração no meio com etanol 10%, o meio contendo etanol e o ácido esteárico foi considerado o mais indicado, uma vez que a diferença entre a concentração de  $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD, no pico da produção de  $\beta$ -CD (em 48 h), na presença de ácido esteárico (Figura 4(b)) foi quase 6 vezes maior do que a diferença de concentração dessas duas moléculas no meio contendo somente etanol, na qual a concentração de  $\alpha$ -CD foi apenas 1,5 vezes maior que a concentração de  $\beta$ -CD, conforme já exposto anteriormente. Portanto, o perfil de produção e as quantidades de  $\alpha$ -CD na presença dos agentes complexantes não tiveram uma variação significativa, ficando mais evidente entre eles a diferença na relação de produção entre  $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD.

O custo de produção de CDs pode ser reduzido quando metodologias de seletividade da enzima são utilizadas e a molécula desejada passar a ser produzida em uma maior quantidade, facilitando sua separação.<sup>17,31</sup> Portanto, não é possível escolher um meio reacional para produção de CDs somente pela quantidade de moléculas produzidas, é preciso avaliar a seletividade da produção, visto que o processo de separação também encarece o produto. E nesse quesito, o meio reacional contendo ácido esteárico foi o mais eficiente.



**Figura 4.** Produção de  $\alpha$ -CD (□),  $\beta$ -CD (■),  $\gamma$ -CD (■) e total de CDs (■) a 65 °C, 15% de amido de mandioca, 0,1% de enzima comercial Toruzyme®, 168 h de reação, na presença de etanol 10%, 1,89% de ácido mirístico (a), e na presença de 10% etanol e 2,36% de ácido esteárico (b). As letras de a até c correspondem ao teste de Tukey realizado analisando a variação do meio de produção em cada tempo de produção; já as letras de A até F, correspondem ao teste de Tukey realizado analisando a variação do tempo de produção em cada meio de produção

### Produção de $\alpha$ -CD e $\beta$ -CD pela enzima Toruzyme® na presença e ausência de etanol e em diferentes meios

Ao verificar as Tabelas 1 e 2, em 3 h de produção, em um meio de reação ausente de etanol, a enzima produziu no máximo 2,428 mg mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -CD e 3,245 mg mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD. Porém, é possível observar que enquanto a produção de  $\beta$ -CD teve uma queda de em torno 0,95 mg mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em 6 h de reação, a produção de  $\alpha$ -CD teve uma queda de 1,15 mg mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Desta forma, em um meio reacional comum, contendo somente enzima e substrato, a produção de  $\beta$ -CD pela enzima Toruzyme® passa a ser maior do que a de  $\alpha$ -CD, quando a reação é estendida por maior tempo.

Apesar de ter sido constatado que o meio de escolha para a produção de  $\alpha$ -CD ser aquele que contém ácido esteárico, como já mencionado anteriormente, a Tabela 1 mostra que o melhor meio reacional é aquele com etanol 10%. Isto comprova, mais uma vez, a importância de considerar a seletividade da enzima na presença de agentes complexantes e/ou solventes.

Ao analisar a Tabela 2 foi verificado que, para um ensaio de 168 h, o meio que demonstrou uma maior efetividade foi aquele contendo o ácido ciclo-hexanocarboxílico, ou seja, este agente complexante foi o mais adequado para promover a seletividade da enzima em favor

da produção de  $\beta$ -CD. Considerando que a  $\beta$ -CD apresenta baixa solubilidade em comparação a  $\alpha$ -CD, a separação desta molécula é bastante simples e de custo reduzido.

Com a análise das Tabelas 1 e 2 foi possível verificar que a enzima Toruzyme® direcionou mais sua produção para  $\beta$ -CD do que  $\alpha$ -CD, mesmo quando usado os agentes complexantes. Isto significa que os agentes complexantes para  $\beta$ -CD demonstraram maior efeito seletivo na produção de CDs.

### CONCLUSÕES

Para a quantificação das CDs por CLAE se faz necessária a separação das mesmas dos agentes complexantes utilizados nos ensaios. Para os complexos realizados com a  $\alpha$ -CD foi possível a descomplexação utilizando solventes, contudo, o mesmo não foi possível para os complexos realizados entre  $\beta$ -CD e seus agentes complexantes. Neste último caso, a única possibilidade de quantificação das CDs produzidas foi por meio de método espectrofotométrico, uma vez que não foi encontrado na literatura informações suficientes para realizar uma metodologia de descomplexação da  $\beta$ -CD dos agentes complexantes utilizados nesta pesquisa. Estudos estão sendo realizados com este propósito.

**Tabela 1.** Produção de  $\alpha$ -CD (mg mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) utilizando a enzima Toruzyme<sup>®</sup> na presença e ausência de etanol e em diferentes meios

Tempo de Produção (h)	Ausência de etanol 10%	Presença de etanol 10%	Presença de etanol 10% e ácido mirístico	Presença de etanol 10% e ácido esteárico
0	0	0	0	0
3	2,428 <sup>b</sup> :A	4,309 <sup>a</sup> :A	2,552 <sup>b</sup> :A	0,704 <sup>c</sup> :B
6	1,275 <sup>b</sup> :B	3,300 <sup>a</sup> :B	1,558 <sup>b</sup> :B	0,438 <sup>c</sup> :C
12	0,511 <sup>c</sup> :BC	1,919 <sup>a</sup> :C	1,131 <sup>b</sup> :C	1,047 <sup>b</sup> :A
24	0,305 <sup>c</sup> :C	0,915 <sup>a</sup> :D	0,745 <sup>b</sup> :D	0,762 <sup>b</sup> :B
36	0,177 <sup>b</sup> :C	0,580 <sup>a</sup> :E	0,507 <sup>a</sup> :DE	0,508 <sup>a</sup> :C
48	0,125 <sup>b</sup> :C	0,384 <sup>a</sup> :EF	0,436 <sup>a</sup> :EF	0,407 <sup>a</sup> :CD
60	0,118 <sup>b</sup> :C	0,277 <sup>a</sup> :FG	0,289 <sup>a</sup> :EFG	0,257 <sup>a</sup> :DE
72	0,079 <sup>b</sup> :C	0,240 <sup>a</sup> :FG	0,193 <sup>a</sup> :FG	0,180 <sup>a</sup> :EF
96	0,052 <sup>b</sup> :C	0,162 <sup>a</sup> :FG	0,136 <sup>a</sup> :G	0,127 <sup>a</sup> :EF
120	0,040 <sup>b</sup> :C	0,117 <sup>a</sup> :G	0,106 <sup>a</sup> :G	0,101 <sup>a</sup> :EF
144	0,031 <sup>a</sup> :C	0,087 <sup>a</sup> :G	0,085 <sup>a</sup> :G	0,074 <sup>a</sup> :F
168	0,019 <sup>a</sup> :C	0,073 <sup>a</sup> :G	0,064 <sup>a</sup> :G	0,059 <sup>a</sup> :F

As letras de a, b e c correspondem ao teste de Tukey realizado analisando a variação do meio em cada tempo de produção; já as letras de A até G, correspondem ao teste de Tukey realizado analisando a variação do tempo em cada meio de produção.

**Tabela 2.** Produção de  $\beta$ -CD (mg mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) utilizando a enzima Toruzyme<sup>®</sup> na presença e ausência de etanol e em diferentes meios

Tempo de Produção (h)	Ausência de etanol 10%	Presença de etanol 10%	Presença de etanol 10% e 3-fenilpropionico	Presença de etanol 10% e ácido ciclo-hexanocarboxílico
0	0	0	0	0
3	3,245 <sup>a</sup> :A	2,436 <sup>b</sup> :A	2,630 <sup>b</sup> :A	1,538 <sup>c</sup> :A
6	2,300 <sup>a</sup> :B	1,718 <sup>c</sup> :B	2,122 <sup>b</sup> :B	0,944 <sup>d</sup> :B
12	1,384 <sup>a</sup> :C	1,085 <sup>c</sup> :C	1,230 <sup>b</sup> :C	0,741 <sup>d</sup> :C
24	0,740 <sup>a</sup> :D	0,641 <sup>b</sup> :D	0,740 <sup>a</sup> :D	0,439 <sup>e</sup> :E
36	0,490 <sup>b</sup> :E	0,481 <sup>b</sup> :E	0,590 <sup>a</sup> :E	0,365 <sup>e</sup> :F
48	0,346 <sup>d</sup> :EF	0,385 <sup>c</sup> :F	0,527 <sup>a</sup> :E	0,445 <sup>b</sup> :E
60	0,229 <sup>d</sup> :FG	0,299 <sup>c</sup> :FG	0,443 <sup>b</sup> :F	0,500 <sup>a</sup> :D
72	0,192 <sup>d</sup> :FG	0,249 <sup>c</sup> :GH	0,386 <sup>b</sup> :F	0,507 <sup>a</sup> :D
96	0,142 <sup>d</sup> :G	0,178 <sup>c</sup> :HI	0,299 <sup>b</sup> :G	0,419 <sup>a</sup> :E
120	0,107 <sup>d</sup> :G	0,137 <sup>c</sup> :I	0,210 <sup>b</sup> :H	0,336 <sup>a</sup> :FG
144	0,082 <sup>d</sup> :G	0,109 <sup>c</sup> :I	0,181 <sup>b</sup> :H	0,316 <sup>a</sup> :G
168	0,070 <sup>d</sup> :G	0,099 <sup>c</sup> :I	0,157 <sup>b</sup> :H	0,280 <sup>a</sup> :H

As letras de a até d correspondem ao teste de Tukey realizado analisando a variação do meio em cada tempo de produção; já as letras de A até I, correspondem ao teste de Tukey realizado analisando a variação do tempo em cada meio de produção.

O uso de agentes complexantes proporcionou um aumento da produção de  $\beta$ -CD e de  $\alpha$ -CD, bem como demonstrou a capacidade destes se complexarem com as CDs correspondentes. Portanto, este estudo corroborou com as informações encontradas em revisões de literatura e, ainda, complementou com resultados de ensaios que demonstraram que o uso do ácido esteárico e do ácido mirístico é bastante eficiente no aumento da produção de  $\alpha$ -CD pela enzima Toruzyme<sup>®</sup>, porém, esta enzima se mostrou mais sensível aos agentes complexantes para  $\beta$ -CD do que aqueles para  $\alpha$ -CD.

O uso dos agentes complexantes como ácido 3-fenilpropionico e do ácido ciclo-hexanocarboxílico, juntamente com a utilização de etanol 10% em um meio reacional, mostrou ser eficaz para uma maior produção de  $\beta$ -CD. Enquanto o ácido ciclo-hexanocarboxílico foi o agente que estimulou em menor escala a produção de  $\beta$ -CD nas primeiras horas de reação, para uma produção de longa duração ele se mostrou mais eficiente, ao contrário do ácido 3-fenilpropionico, que se mostrou muito eficiente para uma produção em menor tempo de reação.

Já em relação à produção de  $\alpha$ -CD, o meio reacional de escolha foi o que continha etanol 10% e o ácido esteárico, num tempo de

produção de 48 h, uma vez que foi o que demonstrou uma maior diferença na relação  $\alpha$ -CD/ $\beta$ -CD.

Desta forma, conclui-se que diversas CGTases podem se tornar economicamente viáveis e com possibilidade de uso industrial com o emprego de etanol e agentes complexantes no meio reacional.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

O material suplementar desse trabalho, Figura 1S, está disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br/>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, Fundação Auracária e a CAPES pelo financiamento da pesquisa e aos demais pesquisadores integrantes da equipe do Laboratório de Biotecnologia Enzimática (LaBE), da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

## REFERÊNCIAS

1. Del Valle, E. M. M.; *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033. [Crossref]
2. Challa, R.; Ahuja, A.; Ali, J.; Khar, R. K.; *AAPS PharmSciTech* **2005**, *6*, 329. [Crossref]
3. Jambhekar, S. S.; Breen, P.; *Drug Discovery Today* **2016**, *21*, 356. [Crossref]
4. Lyra, M. A. M.; Alves, L. D. S.; Fontes, D. A. F.; Soares-Sobrinho, J. L.; Rolim-Neto, P. J.; *Rev. Cienc. Farm. Basica Apl.* **2010**, *31*, 117.
5. Andreus, J.; Dalmolin, M. C.; de Oliveira Junior, I. B.; Barcellos, I. O.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 929. [Crossref]
6. Buschmann, H. J.; Schollmeyer, E.; *J. Cosmet. Sci.* **2002**, *53*, 185.
7. Biwer, A.; Antranikian, G.; Heinze, E.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *59*, 185. [Crossref]
8. Serni, U.; *Eur. J. Rheumatol. Inflammation* **1993**, *12*, 47. [Link] acessado em setembro de 2023
9. Nicolazzi, C.; Venard, V.; Le Faou, A.; Finance, C.; *Antiviral Res.* **2002**, *54*, 121. [Crossref]
10. Aguiar, U. N.; Lima, S. G.; Rocha, M. S.; Freitas, R. M.; Oliveira, T. M.; Silva, R. M.; Moura, L. C. B.; Almeida, L. T. G.; *Quim. Nova* **2014**, *37*, 50. [Crossref]
11. Mura, P.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *101*, 238. [Crossref]
12. Tang, W.; Zou, C.; Da, C.; Cao, Y.; Peng, H.; *Carbohydr. Polym.* **2020**, *240*, 116321. [Crossref]
13. Barreto, L.; Cunha Filho, M.; *Lat. Am. J. Pharm.* **2008**, *27*, 629. [Crossref]
14. Li, Z.; Wang, M.; Wang, F.; Gu, Z.; Du, G.; Wu, J.; Chen, J.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *77*, 245. [Crossref]
15. Rather, M. Y.; Ara, K. Z. G.; Karlsson, E. N.; Adlercreutz, P.; *Process Biochem.* **2015**, *50*, 722. [Crossref]
16. Novozymes A/S; *Starch Application Sheet* 2005.
17. Li, Z.; Chen, S.; Gu, Z.; Chen, J.; Wu, J.; *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *35*, 151. [Crossref]
18. Leemhuis, H.; Kelly, R. M.; Dijkhuizen, L.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 823. [Crossref]
19. Cepea, <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/mandioca.aspx>, acessada em agosto 2023.
20. CycloLab, [https://cyclolab.hu/products/nonionic\\_cyclodextrins-c11/alphacyclodextrin-p59/](https://cyclolab.hu/products/nonionic_cyclodextrins-c11/alphacyclodextrin-p59/), acessada em agosto 2023.
21. CycloLab, [https://cyclolab.hu/products/nonionic\\_cyclodextrins-c11/betacyclodextrin-p60/](https://cyclolab.hu/products/nonionic_cyclodextrins-c11/betacyclodextrin-p60/), acessada em agosto 2023.
22. CycloLab, [https://cyclolab.hu/products/nonionic\\_cyclodextrins-c11/gammacyclodextrin-p61/](https://cyclolab.hu/products/nonionic_cyclodextrins-c11/gammacyclodextrin-p61/), acessada em agosto 2023.
23. Matioli, G.; Zanin, G. M.; Moraes, F. F.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, *84*, 955. [Crossref]
24. Calsavara, L. P. V.; da Cunha, A. R. D.; Balbino, T. A.; Zanin, G. M.; de Moraes, F. F.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *165*, 1485. [Crossref]
25. Blackwood, A. D.; Bucke, C.; *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 704. [Crossref]
26. Tsuchiyama, Y.; Yamamoto, K.; Asou, T.; Okabe, M.; Yagi, Y.; Okamoto, R.; *J. Ferment. Bioeng.* **1991**, *71*, 407. [Crossref]
27. Grade, A.; Rüdiger, V.; Schneider, H. J.; Connors, K. A.; *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 236. [Crossref]
28. Bekers, O.; Uijtendaal, E. V.; Beijen, J. H.; Bult, A.; Underberg, W. J. M.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1991**, *17*, 1503. [Crossref]
29. Tardioli, P. W.; Zanin, G. M.; Moraes, F. F.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 1270. [Crossref]
30. Fenelon, V. C.; Aguiar, M. F. A.; Miyoshi, J. H.; Martinez, C. O.; Matioli, G.; *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2015**, *38*, 1291. [Crossref]
31. Pinheiro, K. H.; do Nascimento, L. B.; Fenelon, V. C.; Barão, C. E.; Matioli, G.; de Moraes, F. F.; *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2017**, *40*, 1305. [Crossref]