

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS NA PRESENÇA DE ETANOL E FORMAÇÃO  
DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO CICLODEXTRINA/ENROFLOXACINA**

Luiza Pedrina Vilxenski Calsavara

Engenheira Química, M. Sc., UEM, 1998

Orientador: Prof. Flávio Faria de Moraes, PhD

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisella Maria Zanin

Tese de Doutorado submetida à  
Universidade Estadual de Maringá,  
como parte integrante dos requisitos  
necessários à obtenção do Grau de  
Doutor em Engenharia Química, área  
de Desenvolvimento de Processos.

Maringá – PR – Brasil

Dezembro de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Tese de Doutorado apresentada por Luiza Pedrina Vilxenski Calsavara perante a Comissão Examinadora do Curso de Doutorado em Engenharia Química em 02 de dezembro de 2010.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Flávio Faria de Moraes, PhD  
Orientador

Profª Drª Gisella Maria Zanin  
Coorientadora

Profª Drª Maria Helena Andrade Santana  
Membro

Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli  
Membro

Profª Drª Graciette Matioli  
Membro

Profª Drª Rita de Cássia Bergamasco  
Membro

Prof. Dr. José Eduardo Olivo  
Membro

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Calsavara, Luiza Pedrina Vilxenki  
C165p            Produção de ciclodextrinas na presença de etanol e  
                  formação de complexos de inclusão  
                  ciclodextrina/enrofloxacina / Luiza Pedrina Vilxenki  
                  Calsavara. -- Maringá, 2010.  
  
                  xxvii, 140 f. : il. color., figs., tabs.  
  
                  Orientador: Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes.  
                  Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gisella Maria Zanin.  
  
                  Tese (doutorado em Engenharia Química) - Universidade  
                  Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de  
                  Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
                  Química, 2010  
  
                  1. Ciclodextrina - Produção - Etanol. 2. Toruzyme. 3.  
                  Ciclodextrina - Milho e mandioca. 4. Ciclodextrina -  
                  Bateladas sequenciadas. 5. Ciclodextrina - Aplicação  
                  farmacológica. 6. Enrofloxacina. I. Moraes, Flávio Faria  
                  de, orient. II. Zanin, Gisella Maria, Co-orient. III.  
                  Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia.  
                  Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-  
                  Graduação em Engenharia Química. IV. Título.  
  
                  CDD 21.ed.660.634

zss-000241

*Esta Tese é dedicada:*

*Ao meu marido Valmir, pelo apoio, paciência e imensa colaboração.*

*Aos meus filhos Larissa e Nicolás que dão um sentido especial às nossas vidas e por quem todos os esforços valem a pena.*

*Aos meus pais Judith e Luiz, que com todas as limitações impostas em suas vidas, sempre me incentivaram.*

*A vocês, o meu amor!*

## **Agradecimentos**

- A Deus, que sempre me deu forças.
- A toda minha família, pelo carinho e estímulo.
- Ao Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes pela grande contribuição científica, pela competente orientação deste trabalho, e principalmente, por sempre ter me incentivado.
- À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisella Maria Zanin pela coorientação deste trabalho, pelas valiosas sugestões e pelo interesse demonstrado.
- Ao Eng<sup>o</sup> Químico Lauro Mitsuaki Kambara, o grande amigo, cuja colaboração foi primordial para que eu pudesse me dedicar a esse trabalho, em muitos momentos assumindo minhas tarefas.
- Aos alunos Alessandro Rogério Dias da Cunha, Tiago Albertini Balbino e Henrique Setem Ferrari pela preciosa colaboração. Desejo a vocês um futuro brilhante!
- Aos funcionários e professores do DEQ, pelo bom ambiente de trabalho. Obrigada pela sua amizade!
- Aos professores e funcionários do PEQ, pela orientação e atenção dispensadas.
- Aos meus colegas do doutorado, pela amizade e pelos momentos de descontração que tivemos juntos, tornando mais amenas as horas no laboratório.
- À CAPES, CNPq, PACT, Fundação Araucária e DEQ/UEM pelo apoio financeiro.
- À Novozymes pela doação das enzimas, às empresas Wacker Consortium e Cyclolab pela doação da  $\gamma$ -CD, à Formil Química Ltda pela doação da Enrofloxacina e à Pasquini & Cia Ltda pela doação da fécula de mandioca.
- A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

***OBRIGADA!***

*“O êxito na vida não se mede pelo que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.” (Abraham Lincoln)*

## **PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS NA PRESENÇA DE ETANOL E FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO CICLODEXTRINA/ENROFLOXACINA**

**AUTORA: LUIZA PEDRINA VILXENSKI CALSAVARA**

**ORIENTADOR: Prof. FLÁVIO FARIA DE MORAES, PhD**

**COORIENTADORA: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> GISELLA MARIA ZANIN**

Tese de Doutorado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 - 09; CEP: 87020-900 - Maringá - PR, Brasil, defendida em 2 de dezembro de 2010. 167 p.

### **RESUMO**

No Brasil, apesar de haver um grande incentivo para a produção de ciclodextrinas (CDs) devido ao seu alto valor agregado e matéria-prima (amido) disponível a baixo custo, não existem até o momento processos industriais para a sua produção. Portanto, a proposta deste trabalho foi o desenvolvimento de tecnologia de produção e separação de CDs a partir de processos em batelada única e sequenciada, usando amidos comerciais de milho e mandioca, com pré-tratamento ou não dos grânulos de amido, e enzima ciclomaltodextrinoglucano-transferase (CGTase) comercial, na presença e ausência de etanol. Também foi feito o estudo da aplicação farmacológica das CDs por meio da formação do complexo de inclusão com enrofloxacina (FLOX), para remoção do sabor amargo e aumento da solubilidade deste antibiótico.

Na primeira etapa produziu-se CDs com o amido e a enzima ciclomaltodextrinoglucano-transferase (CGTase) na presença de etanol e aplicou-se duas bateladas sequenciadas para aumentar o rendimento em CDs por carga de enzima. Usou-se a enzima Toruzyme® e os substratos foram os amidos comerciais de milho e mandioca. Todos os experimentos foram conduzidos em um reator fechado de 100 mL, sob agitação magnética, com 15 % (m/v) de amido, a 65 °C e pH 6, inicialmente por um período de 24 h. As amostras coletadas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, que determina  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD, ou pelo método colorimétrico da fenolftaleína a 550 nm, que é seletivo para a  $\beta$ -CD. Com o objetivo de otimizar as concentrações de etanol e enzima, a concentração de etanol foi variada (0, 5, 10 e 15 % (v/v)) usando 0,1 % (v/v) de enzima. Então, fixando-se a concentração selecionada de etanol, a concentração de enzima foi variada (0,05, 0,1 e 0,2 % (v/v)). Para ambos os substratos, as condições ótimas para maior rendimento foram determinadas como sendo 0,1 % (v/v) enzima, 10 % (v/v) etanol e 12 h de reação, levando a um aumento moderado na produção de  $\beta$ -CD ( $\cong$  20 %) e um aumento expressivo na de  $\alpha$ -CD ( $\cong$  200 %) ao se comparar

com a reação sem etanol. A produção de  $\gamma$ -CD foi muito baixa (em torno de  $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), independente do substrato e da concentração de etanol. O teor de proteína da Toruzyme®, determinado pelo método de Bradford, foi de  $5,65 \text{ mg mL}^{-1}$ , e sua atividade específica por massa de proteína, determinada pelo método das velocidades iniciais usando amido de milho como substrato, foi de  $65,45 \text{ U mg}^{-1}$ , para a soma da produção das três CDs. Para o modo de reação em bateladas sequenciadas, a primeira batelada foi conduzida por 12 h. A enzima foi então adsorvida em grânulos de amido pré-tratados a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  ou em amido cru, e a segunda batelada foi conduzida com esse material por 24 h. A aplicação de duas bateladas sequenciadas, com pré-tratamento do amido para a segunda batelada, na presença de 10 % (v/v) de etanol, levou ao maior rendimento em CDs, aumentando em 184 % e 120 % (para amido de milho e de mandioca, respectivamente) o rendimento em CDs com relação ao processo com batelada única na ausência de etanol, utilizando-se apenas uma carga enzimática. Os processos com amido de mandioca geraram em média 30 % mais CDs que aqueles com amido de milho. Pode-se concluir que a produção de CDs com as condições combinadas de usar grânulos de amido como substrato, uma enzima termoestável, bateladas sequenciadas, carga única de enzima (com recuperação de enzima por adsorção) e 10 % (v/v) de etanol é um desenvolvimento do processo que apresenta vantagens tais como maior rendimento em CDs e temperatura relativamente alta para um processo enzimático ( $65 \text{ }^\circ\text{C}$ ), que evita contaminação microbiana e permite a separação de amido não reagido como um resíduo insolúvel que pode ser facilmente centrifugado.

Na segunda parte deste trabalho foram produzidos complexos de inclusão com o antibiótico enrofloxacina (FLOX) empregando  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e hidroxipropil- $\beta$ -CD, com o objetivo de reduzir o sabor amargo da FLOX e aumentar sua solubilidade. Medidas de solubilidade foram realizadas de acordo com o método de Higuchi e Connors (1965), usando diagramas de solubilidade para verificar a formação de complexos de inclusão, determinar o aumento da solubilidade e a constante de estabilidade. Soluções das CDs foram preparadas nas concentrações iniciais ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\alpha$ -CD, 120,8;  $\beta$ -CD, 18,0;  $\gamma$ -CD, 207,5 e hidroxipropil- $\beta$ -CD, 263,1 e então diluídas para diferentes concentrações em volumes de 10 mL aos quais a FLOX foi adicionada (0,1000 g). As soluções foram mantidas sob agitação (150 rpm) a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por cinco dias e então filtradas. O filtrado foi analisado por espectrofotometria a 272 nm. A inclusão da FLOX na  $\beta$ -CD apresentou o maior valor para a constante de estabilidade do complexo ( $K = 24,8 \text{ L mol}^{-1}$ ) e o maior aumento para a solubilidade da FLOX ( $n = 1,4$ ) em relação à quantidade de CD oferecida. Porém, a maior solubilidade total da FLOX,  $0,61 \text{ g L}^{-1}$  ( $1,697 \text{ mmol L}^{-1}$ ), foi obtida utilizando-se a HP- $\beta$ -CD ( $n = 4,2$ ). Também foi determinada a influência do ácido cítrico na solubilidade da FLOX pura ou em conjunto com  $\beta$ -CD. Observou-se que  $15 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido cítrico dissolveram toda a FLOX oferecida (0,1000 g). O pH da solução ficou em torno de 5. O aumento gradual na concentração de  $\beta$ -CD na presença de  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  do ácido não aumentou o grau de solubilização da FLOX.



## **PRODUCTION OF CYCLODEXTRINS IN THE PRESENCE OF ETHANOL AND FORMATION OF INCLUSION COMPLEXES CYCLODEXTRIN/ENROFLOXACIN**

**AUTHOR: LUIZA PEDRINA VILXENSKI CALSAVARA**

**SUPERVISOR: Prof. FLÁVIO FARIA DE MORAES, PhD**

**CO-SUPERVISOR: Prof. Dr. GISELLA MARIA ZANIN**

Doctoral Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; State University of Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 - 09; CEP: 87020-900 - Maringá - PR, Brazil, presented on December 2<sup>nd</sup> 2010. 167 p.

### **ABSTRACT**

In Brazil, although there is a great incentive for the production of cyclodextrins (CDs) due to their high added value and the raw material (starch) is available at low cost, there are no industrial processes for their production. Therefore, the proposal of this work had as objective the development of technology for production and separation of CDs from single batch and sequential batch processes, using commercial corn starch and cassava starch, with or without pretreatment of starch granules, and commercial cyclomaltodextrin glucanotransferase enzyme (CGTase), in the presence and absence of ethanol. It was also studied the pharmacological application of CDs through the formation of inclusion complex with enrofloxacin (FLOX), to remove the bitter taste and increase the solubility of this antibiotic.

In the first part CDs were produced using starch granules and cyclomaltodextrin-glucanotransferase (CGTase) enzyme in the presence of ethanol and applying two sequential batches to increase the CD yield per enzyme charge. The enzyme used was Toruzyme® and the substrates were commercial corn starch and cassava starch. All experiments were run in a 100 mL closed batch reactor, under magnetic stirring, with 15 % (w/v) starch, at 65 °C and pH 6, initially for a period of 24 h. Collected samples were analyzed by high performance liquid chromatography, which determines  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ -CD, or by the phenolphthalein colorimetric method at 550 nm, which is selective for  $\beta$ -CD. Aiming at optimizing the concentration of ethanol and enzyme, ethanol concentration was initially varied (0, 5, 10, and 15 % (v/v)) using enzyme 0.1 % (v/v). Then, fixing the selected ethanol concentration, enzyme concentration was varied (0.05, 0.1, and 0.2 % (v/v)). For both substrates, the optimum conditions for greater yield were determined as 0.1 % (v/v) enzyme, 10 % (v/v) ethanol and 12 h of reaction, leading to a moderate increase in  $\beta$ -CD ( $\cong 20$  %) and an expressive increase in  $\alpha$ -CD production ( $\cong 200$  %) compared with the reaction without

ethanol. Independently of the substrate and ethanol concentration,  $\gamma$ -CD production was very low (around  $4.0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). The protein content of Toruzyme®, determined by the Bradford method, was  $5.65 \text{ mg mL}^{-1}$  and its specific activity per mass of protein, determined by the initial velocities method using corn starch as substrate, was  $65.45 \text{ U mg}^{-1}$  for the sum of the production of the three CDs. For the sequential batch reaction mode, the first batch was carried out for 12 h. The enzyme was then adsorbed either on  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  pretreated starch granules or on raw starch, and a second batch was run with this material for 24 h. The application of two sequential batches, with starch pretreatment for the second batch, in the presence of 10 % (v/v) ethanol, produced the highest yield of CDs, increasing in 184 % and 120 % (for cornstarch and cassava starch, respectively) the CD yield relative to the single batch process in the absence of ethanol, using only a single enzyme charge. Processes that used cassava starch as substrate yielded on average 30 % more CDs than those with corn starch. In conclusion, the production of CDs with the combined conditions of using starch granules as substrate, a thermostable enzyme, sequential batches, a single enzyme charge (with enzyme recovery by adsorption), and 10 % (v/v) ethanol is a process development that provides advantages such as higher cyclodextrin yield and relatively high temperature for an enzymatic process ( $65 \text{ }^\circ\text{C}$ ), which is protective of microbial contamination and allows the practical separation of unreacted starch as an insoluble residue by centrifugation

In the second part of this work, inclusion complexes using  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and hydroxypropyl- $\beta$ -CD were produced with the antibiotic enrofloxacin (FLOX), with the objective of reducing FLOX bitter flavor and increasing its solubility. Phase solubility measurements were carried out according to the method of Higuchi and Connors (1965), to verify the formation of inclusion complexes, and to determine the solubility enhancement and constant of stability. CDs solutions were prepared at the initial concentrations ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\alpha$ -CD, 120.8;  $\beta$ -CD, 18.0;  $\gamma$ -CD, 207.5 and hydroxypropyl- $\beta$ -CD, 263.1, then diluted to different concentrations forming 10 mL volumes to which FLOX was added (0.1000 g). The solutions were kept under agitation (150 rpm) at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  for five days and then filtered. The filtrate was analyzed by spectrophotometry at 272 nm. FLOX inclusion in  $\beta$ -CD showed the highest value of the complex stability constant ( $K = 24.8 \text{ L mol}^{-1}$ ) and the larger increase in FLOX solubility ( $n = 1.4$ ) relative to the amount of CD offered. However, the highest value of FLOX total solubility,  $0.61 \text{ g L}^{-1}$  ( $1.697 \text{ mmol L}^{-1}$ ), was obtained using HP- $\beta$ -CD ( $n = 4.2$ ). It was also determined the influence of citric acid on the solubility of FLOX alone or as an adjunct to  $\beta$ -CD. It was observed that  $15 \text{ mmol L}^{-1}$  citric acid dissolved all offered FLOX (0.1000 g). The solution pH was around 5. The gradual increase in concentration of  $\beta$ -CD in the presence of  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  of the acid did not increase the degree of solubilization of FLOX.

## INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Representação esquemática da estrutura das CDs (LOFTSSON <i>et al.</i> , 2005, figuras modificadas por SÁ BARRETO e CUNHA-FILHO, 2008).....	6
Figura 2.2 – Modelo tridimensional das CDs, com apresentação dos átomos de carbono (cinza), hidrogênio (cinza claro-branco) e oxigênio (preto) (CHAPLIN, 2009).....	6
Figura 2.3 – Representação esquemática do polímero $\beta$ -CD-epicloridrina (van de MANAKKER <i>et al.</i> , 2009).....	9
Figura 2.4 – Efeito da concentração do amido de batata no rendimento da produção de $\beta$ -CD (adaptado de BERGSMA <i>et al.</i> , 1988).....	11
Figura 2.5 – Dados experimentais para a produção de ciclodextrinas, que demonstram que o rendimento para todas as CDs decresce com o aumento da DE da solução (adaptado de HORIKOSHI <i>et al.</i> (1981b)).	12
Figura 2.6 – Ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (●) Molécula de glicose com a extremidade redutora; (○) Molécula de glicose sem a extremidade redutora. As setas indicam os pontos da molécula de amido preferidos para o ataque. (Adaptada de van der VEEN <i>et al.</i> , 2000).	16
Figura 2.7 – Reações envolvidas na cinética de produção das CDs, onde $G_n$ , $G_m$ e $G_x$ são oligossacarídeos com n, m e x unidades de glicose, respectivamente. $cG_x$ é a $\alpha$ -CD para $x = 6$ , $\beta$ -CD para $x = 7$ , e $\gamma$ -CD para $x = 8$ (Adaptada de van der VEEN <i>et al.</i> , 2000; SOUZA <i>et al.</i> , 2010).	20
Figura 2.8 – Estrutura esquemática do sítio ativo de CGTase de <i>Bacillus sp.</i> 1-5 baseada em um estudo cristalográfico por raios X de CGTase de <i>B. circulans</i> (KIM <i>et al.</i> , 1997; KLEIN <i>et al.</i> , 1992). Os subsítios para ligação de sete unidades glicosila são designados de $S_5$ a $S_2'$ da extremidade não-redutora à redutora. A ligação glicosídica é quebrada entre $G_7$ e $G_8$ ocupando os subsítios $S_1$ e $S_1'$ . São mostradas as posições relativas de Tyr-89, Asn-94 e Tyr-100.	22
Figura 2.9 – Representação estrutural de uma enzima CGTase, com um substrato de maltonaose ligado aos subsítios $-7$ a $+2$ (KELLY <i>et al.</i> , 2009). O painel lateral mostra uma vista em detalhe da região do núcleo catalítico, com representação esquemática das interações entre os resíduos dos nove sítios da CGTase que se ligam ao substrato maltonaose. As principais contribuições de cada subsítio para a formação de	

ciclodextrinas são destacadas. Este painel foi adaptado de Uitdehaag <i>et al.</i> (1999).....	23
Figura 2.10 – Complexos fármaco-ciclodextrinas (adaptado de SILVA, 2008).....	37
Figura 2.11 – Diagramas de solubilidade de substâncias complexadas em CD (adaptado de Higuchi e Connors, 1965).....	38
Figura 2.12 – Fórmula estrutural da enrofloxacina (Mahendran <i>et al.</i> , 2010). ....	42
Figura 2.13 – Solubilidade da FLOX em função do pH da solução (LIZONDO <i>et al.</i> , 1997).	42
Figura 3.1 – Reatores tipo batelada. ....	48
Figura 3.2 – Fluxograma dos procedimentos utilizados na produção de CDs por batelada única e separação da $\beta$ -CD por cristalização.....	58
Figura 3.3 – Fluxograma simplificado dos procedimentos utilizados na produção de CDs por batelada única e separação da $\beta$ -CD por cristalização. ....	59
Figura 3.4 – Fluxograma dos procedimentos utilizados na produção de CDs em bateladas sequenciadas e com recuperação das CDs dos precipitados. Para as etapas de centrifugação utilizou-se 30 °C, 20 minutos, 12000 x g. ....	62
Figura 3.5 – Fluxograma simplificado da cristalização e recristação de CDs a partir de um processo de produção de CDs com batelada única.....	65
Figura 4.1 – Reta ajustada para a determinação do teor de proteína, pelo método de Bradford (y = absorvância, x = concentração de proteína).....	67
Figura 4.2 – Reta ajustada para a determinação de glicose pelo método GOD-POD (y = absorvância, x = concentração de glicose). ....	68
Figura 4.3 – Ajuste dos dados de absorvância a 550 nm em função da concentração de $\beta$ -CD em $\text{mmol L}^{-1}$ . ....	68
Figura 4.4 – Cromatograma de um padrão contendo $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de $\alpha$ -CD, $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de $\beta$ -CD e $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de $\gamma$ -CD. Análise por CLAE: coluna Microsorb-MV, 100-5, Amino 250x4; fase móvel acetonitrila 65 % e água 35 % na vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura ambiente; detetor IR, atenuação 1. ....	69
Figura 4.5 – Curvas-padrão das ciclodextrinas $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ , a partir das áreas dos picos dos cromatogramas, conforme Tabela 4.1. ....	70
Figura 4.6 – Produção de CDs a 65 °C, pH 6, 15 % (v/v) de etanol, a partir do precipitado e	

do sobrenadante resultantes do pré-tratamento do amido de milho 15 % (m/v) a 65 °C e posterior centrifugação. Determinação da $\beta$ -CD pelo MCFE. ....	71
Figura 4.7 – Produção de CDs com amido de milho 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, 15 % (v/v) de etanol, variando-se a concentração de enzima CGTase. Determinação da $\beta$ -CD pelo MCFE. ....	72
Figura 4.8 – Produção de CDs com amido de milho 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, 15 % (v/v) de etanol e 0,1 % (v/v) de enzima CGTase. Amostras analisadas por CLAE.....	73
Figura 4.9 – Comparação entre os métodos de dosagem de $\beta$ -CD (MCFE e CLAE). Utilizou-se amido de milho 15 % (m/v), 15 % (v/v) de etanol, 65 °C, pH 6 e 0,1 % (v/v) de CGTase na produção de CDs. ....	73
Figura 4.10 – Efeito de diferentes concentrações de etanol na produção de $\alpha$ -CD, com amido 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6 e 0,1 % (v/v) de enzima. Amostras analisadas por CLAE. ..	74
Figura 4.11 – Efeito de diferentes concentrações de etanol na produção de $\beta$ -CD, com amido 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6 e 0,1 % (v/v) de enzima. Amostras analisadas por CLAE. Concentração de etanol (% (v/v)): 0 (●), 5 (○), 10 (□) e 15 (Δ). ....	75
Figura 4.12 – Produção de CDs com amido 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, 0,1 % (v/v) de enzima e 10 % (v/v) de etanol. Amostras analisadas por CLAE. ....	76
Figura 4.13 – Produção de CDs com amido de milho 15 % (m/v), a 65°C, pH 6,0, 10 % (v/v) de etanol, variando-se a concentração de enzima CGTase. Determinação da $\beta$ -CD pelo MCFE. ....	77
Figura 4.14 – Produção de $\beta$ -CD com amido de milho 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, 10 % (v/v) de etanol, para aplicação do método das velocidades iniciais. Determinação da $\beta$ -CD pelo MCFE. ....	77
Figura 4.15 – Produção de CDs com amido de milho 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, 10 % (v/v) de etanol, para aplicação do método das velocidades iniciais. Determinação das CDs por CLAE e MCFE. ....	78
Figura 4.16 – Produção de CDs com amido de milho ou mandioca 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, pelos processos: 1B = uma única batelada, 2B = duas bateladas sem pré-tratamento, 2BP = duas bateladas com pré-tratamento, 1B-SE = uma única batelada sem etanol, 2BP-SE = duas bateladas com pré-tratamento, sem etanol. ....	80

- Figura 4.17 – Produção de CDs com amido de milho ou mandioca 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, etanol 10 % (v/v), pelos processos: 1B = uma única batelada e 2BP = duas bateladas com pré-tratamento..... 80
- Figura 4.18 – Produção de CDs, com posterior precipitação por cristalização, com amido de milho ou mandioca 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, pelos processos: 1B = uma única batelada, 2B = duas bateladas sem pré-tratamento, 2BP = duas bateladas com pré-tratamento, 1B-SE = uma única batelada sem etanol, 2BP-SE = duas bateladas com pré-tratamento, sem etanol..... 85
- Figura 4.19 – Cromatograma do sobrenadante S<sub>1</sub> antes da cristalização, diluído 40 vezes para a análise por CLAE..... 86
- Figura 4.20 – Cromatograma do precipitado (Pc<sub>1</sub>) obtido com a cristalização das CDs presentes em S<sub>1</sub>. Amostra para análise por CLAE: 0,1 g/500 mL..... 87
- Figura 4.21 – Cromatograma do precipitado (Prc<sub>1</sub>) obtido com a recristalização das CDs a partir do precipitado Pc<sub>1</sub> ressuspenso. Amostra para análise por CLAE: 0,1 g/100 mL.. 87
- Figura 4.22 – Cromatograma do precipitado (Prc<sub>2</sub>) obtido com a cristalização das CDs a partir do sobrenadante Sb. Amostra para análise por CLAE: 0,1 g/100 mL..... 88
- Figura 4.23 – Cromatograma do precipitado (Prc<sub>3</sub>) obtido com a cristalização das CDs, a partir do sobrenadante Sc. Amostra para análise por CLAE: 0,1 g/100 mL..... 88
- Figura 4.24 – Cromatograma do precipitado (Pc<sub>2</sub>) obtido com a cristalização de Sa (sobrenadante resultante da primeira cristalização a partir de S<sub>1</sub>). Amostra para análise: 0,1 g/100 mL. .... 89
- Figura 4.25 – Cromatograma do precipitado (Pp) obtido com a cristalização das CDs presentes em (S<sub>2</sub>+S<sub>3</sub>+S<sub>4</sub>+S<sub>5</sub>), produzidas com amido de milho. Amostra para análise por CLAE: 0,1 g/100 mL..... 90
- Figura 4.26 – Cromatograma do precipitado obtido com a recristalização das CDs a partir do precipitado (ressuspenso), apresentado na Figura 4.25, produzidas com amido de milho. Amostra para análise por CLAE: 0,1 g/100 mL..... 91
- Figura 4.27 – Cromatograma do precipitado (Pp) obtido com a cristalização das CDs presentes em (S<sub>2</sub>+S<sub>3</sub>), produzidas com amido de mandioca. Amostra para análise por CLAE: 0,2 g/100 mL..... 91

Figura 4.28 – Cromatograma do precipitado obtido com a recristalização das CDs a partir do precipitado (ressuspensão), apresentado na Figura 4.27, produzidas com amido de mandioca. Amostra para análise por CLAE: 0,5 g/100 mL. ....	92
Figura 7.1 – Espectro de absorvância das soluções de FLOX 0,02 g L <sup>-1</sup> sem filtrar e após filtração. ....	104
Figura 7.2 – Limite da linearidade de soluções de FLOX, com medidas de absorvância a 272 nm. ....	106
Figura 7.3 – Faixa de linearidade da absorção espectrofotométrica na análise da FLOX, para o comprimento de onda de 272 nm, em função da concentração (y = absorvância; x = concentração de FLOX). ....	107
Figura 7.4 – Influência da β-CD sobre o espectro de absorção da FLOX. ....	108
Figura 7.5 – Espectros de absorvância das soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada (10 g L <sup>-1</sup> ) e variou-se a concentração de α-CD de 0 a 120 g L <sup>-1</sup> , conforme Tabela 7.3. ....	110
Figura 7.6 – Solubilidade da FLOX em função da concentração de α-CD (y = concentração de FLOX; x = concentração de α-CD). ....	110
Figura 7.7 – Espectros de absorção das soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada (10 g L <sup>-1</sup> ) e variou-se a concentração de β-CD de 0 a 18,0 g L <sup>-1</sup> , conforme Tabela 7.5. ....	112
Figura 7.8 – Solubilidade da FLOX em função da concentração de β-CD (y = concentração de FLOX; x = concentração de β-CD). ....	113
Figura 7.9 – Espectros de absorção das soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada (10 g L <sup>-1</sup> ) e variou-se a concentração de γ-CD de 0 a 207 g L <sup>-1</sup> , conforme Tabela 7.7. ....	114
Figura 7.10 – Solubilidade da FLOX em função da concentração de γ-CD (y = concentração de FLOX; x = concentração de γ-CD). ....	114
Figura 7.11 – Espectro de absorção das soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada (10 g L <sup>-1</sup> ) e variou-se a concentração de HP-β-CD de 0 a 263 g L <sup>-1</sup> , conforme Tabela 7.9. ....	116

Figura 7.12 – Solubilidade da FLOX em função da concentração de HP- $\beta$ -CD (y = concentração de FLOX; x = concentração de HP- $\beta$ -CD).....	116
Figura 7.13 – Solubilidade da FLOX em função da concentração de CDs (y = concentração de Flox; x = concentração de CDs). .....	117
Figura 7.14 – Solubilidade da FLOX em função da concentração de ácido cítrico.....	120
Figura 7.15 – Solubilidade da FLOX em função do pH da solução.....	120
Figura 7.16 – Solubilidade da FLOX em função da concentração de $\beta$ -CD com ácido cítrico 5 mmol L <sup>-1</sup> . .....	122
Figura 7.17 – Espectro de absorção das soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada (10 g L <sup>-1</sup> ) e a concentração de ácido cítrico (5 mmol L <sup>-1</sup> ), e variou-se a concentração de $\beta$ -CD.....	122
Figura 7.18 – Curvas de DSC para (a) enrofloxacina, (b) $\alpha$ -CD, e (c) produto obtido a partir do método kneading com enrofloxacina e $\alpha$ -CD (razão molar 1:1).....	123
Figura 7.19 – Curvas de DSC para (a) enrofloxacina, (b) $\beta$ -CD, e (c) produto obtido a partir do método kneading com enrofloxacina e $\beta$ -CD (razão molar 1:1). .....	124
Figura 7.20 – Curvas de DSC para (a) enrofloxacina, (b) $\gamma$ -CD, e (c) produto obtido a partir do método kneading com enrofloxacina e $\gamma$ -CD (razão molar 1:1).....	124
Figura 7.21 – Curvas de DSC para (a) enrofloxacina, (b) HP- $\beta$ -CD, e (c) produto obtido a partir do método kneading com enrofloxacina e HP- $\beta$ -CD (razão molar 1:1). .....	125
Figura 7.22 – Curvas termogravimétricas para enrofloxacina, CDs (A = $\alpha$ -CD, B = $\beta$ -CD, C = $\gamma$ -CD e D = HP- $\beta$ -CD), e o produto obtido a partir do método kneading com enrofloxacina e cada uma das CDs (razão molar 1:1). .....	126



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Propriedades físico-químicas da $\alpha$ - $\beta$ - e $\gamma$ -CD (FRÖMMING e SZEJTLI, 1994; SZEJTLI, 1988; TARDIOLI, 1998).....	7
Tabela 2.2 – Solubilidade das CDs em água, em várias temperaturas (FRÖMMING e SZEJTLI, 1994).....	8
Tabela 2.3 – Proporção de amilose e amilopectina e temperaturas nas quais 5, 50 e 95 % dos grânulos de amido de diferentes procedências são gelatinizados (SWINKELS, 1985)...	15
Tabela 2.4 – Substratos para a produção de CDs. ....	19
Tabela 2.5 – Processos de produção e purificação de CDs. ....	34
Tabela 2.4 – Medicamentos atualmente disponíveis no mercado mundial contendo CDs (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007). ....	36
Tabela 4.1 – Determinação das curvas padrão das ciclodextrinas $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ , a partir das áreas dos cromatogramas. Concentração de ciclodextrina = x, área do pico = y, coeficiente de correlação da reta ajustada = R.....	70
Tabela 4.2 – Atividade específica da enzima por massa de proteína ( $A_E$ ), determinada pelo método das velocidades iniciais, com as amostras analisadas por MCFE e CLAE. C = concentração de ciclodextrina ( $\text{mmol L}^{-1}$ ), t = tempo de reação (min), R = coeficiente de correlação. ....	78
Tabela 4.3 – Composição do precipitado contendo as CDs produzidas e cristalizadas, analisado por CLAE. Pp = precipitado obtido, Glic = glicose, ANC = amido não convertido em CDs, $CDs = (\alpha\text{-CD} + \beta\text{-CD})$ , RaCDs = rendimento de CDs produzidas em relação ao amido de milho utilizado, Ra $\beta$ = rendimento em $\beta$ -CD produzida em relação ao amido de milho.....	79
Tabela 4.4 – Produção de CDs com amido de milho 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, pelos processos: 1B = uma única batelada, 2B = duas bateladas sem pré-tratamento, 2BP = duas bateladas com pré-tratamento, 1B-SE = uma única batelada sem etanol, 2BP-SE = duas bateladas com pré-tratamento, sem etanol. ( $S_4$ e $S_5$ = sobrenadantes obtidos após a recuperação de $P_1$ e $P_3$ , respectivamente) .....	81
Tabela 4.5 – Produção de CDs com amido de mandioca 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, pelos	

processos: 1B = uma única batelada, 2B = duas bateladas sem pré-tratamento, 2BP = duas bateladas com pré-tratamento, 1B-SE = uma única batelada sem etanol, 2BP-SE = duas bateladas com pré-tratamento, sem etanol. ....	82
Tabela 4.6 – Composição dos precipitados (Pp) contendo as CDs produzidas e cristalizadas a partir do amido de milho, analisados por CLAE. ANC = amido não convertido em CDs, $CDs = (\alpha\text{-CD} + \beta\text{-CD} + \gamma\text{-CD})$ , RaCDs = rendimento de CDs produzidas em relação ao amido utilizado, Ra $\beta$ = rendimento de $\beta$ -CD produzida em relação ao amido utilizado. 84	84
Tabela 4.7 – Composição dos precipitados (Pp) contendo as CDs produzidas e cristalizadas a partir do amido de mandioca, analisados por CLAE. ANC = amido não convertido em CDs, $CDs = (\alpha\text{-CD} + \beta\text{-CD})$ , RaCDs = rendimento de CDs produzidas em relação ao amido utilizado, Ra $\beta$ = rendimento de $\beta$ -CD produzida em relação ao amido utilizado. 84	84
Tabela 4.8 – Composição dos precipitados obtidos contendo as CDs produzidas e cristalizadas a partir do amido de milho 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, volume de reação de 500 mL. Análises por CLAE. ANC = amido não convertido em CDs. ....	86
Tabela 4.9 – Composição dos precipitados (Pp) obtidos contendo as CDs produzidas em bateladas sequenciadas, cristalizadas e recristalizadas, a partir do amido de milho ou de mandioca 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, volume de reação de 100 mL. Análises por CLAE. ANC = amido não convertido em CDs. ....	90
Tabela 6.1 – Soluções utilizadas para a medida da influência da $\beta$ -CD sobre o espectro de absorção da FLOX (Solução 1: 0,004 g de FLOX/100 mL de água e Solução 2: 1,8 g de $\beta$ -CD/100 mL de água). ....	99
Tabela 6.2 – Soluções de ciclodextrinas utilizadas nos estudos de solubilidade da FLOX. ...	101
Tabela 6.3 – Soluções de $\beta$ -CD contendo 5 mmol L <sup>-1</sup> de ácido cítrico e 0,1000 g de FLOX, utilizadas nos estudos de solubilidade da FLOX. Solução 1: ácido cítrico 5 mmol L <sup>-1</sup> contendo 0,01 % (m/v) de azida sódica. Solução 2: $\beta$ -CD 1,8 g /100 mL de solução 1. Volume total de 10 mL. ....	103
Tabela 7.1 – Absorvância a 272 nm para diferentes concentrações da FLOX. ....	106
Tabela 7.2 – Soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada e variou-se a concentração de $\alpha$ -CD. Concentração da solução de $\alpha$ -CD utilizada nas diluições: 120,80 g L <sup>-1</sup> . ....	109

Tabela 7.3 – Concentrações de FLOX solubilizada após complexação com $\alpha$ -CD. Amostras filtradas e diluídas em 1:30 para leitura da absorvância em espectrofotômetro.....	110
Tabela 7.4 – Soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada e variou-se a concentração de $\beta$ -CD. Concentração da solução de $\beta$ -CD utilizada nas diluições: 18,00 g L <sup>-1</sup> .....	111
Tabela 7.5 – Concentrações de FLOX solubilizada após complexação com $\beta$ -CD. Amostras filtradas e diluídas em 1:15 para leitura da absorvância em espectrofotômetro.....	112
Tabela 7.6 – Soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada e variou-se a concentração de $\gamma$ -CD. Concentração da solução de $\gamma$ -CD utilizada nas diluições: 207,50 g L <sup>-1</sup> .....	113
Tabela 7.7 – Concentrações de FLOX solubilizada após complexação com $\gamma$ -CD. Amostras filtradas e diluídas em 1:40 para leitura da absorvância em espectrofotômetro.....	114
Tabela 7.8 – Soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada e variou-se a concentração de HP- $\beta$ -CD. Concentração da solução de HP- $\beta$ -CD utilizada nas diluições: 263,10 g L <sup>-1</sup> .....	115
Tabela 7.9 – Concentrações de FLOX solubilizada após complexação com HP- $\beta$ -CD. Amostras filtradas e diluídas em 1:40 para leitura da absorvância em espectrofotômetro. ....	115
Tabela 7.10 – Constantes K e n, obtidas como resultado da aplicação das Equações 6.2 e 6.3 aos coeficientes lineares das Figuras 7.6, 7.8, 7.10 e 7.12. CM <sub>CD</sub> é a concentração máxima de CD utilizada e EC é a eficiência da complexação. ....	118
Tabela 7.11 – Concentrações das soluções do teste de solubilidade da FLOX na presença de ácido cítrico *. ....	119
Tabela 7.12 – Concentrações das soluções do teste de solubilidade da FLOX na presença de ácido cítrico e $\beta$ -CD. <sup>a</sup> .....	121

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Absorvância da amostra a 272 nm
ABS	Absorvância da amostra a 550 nm
ABS <sub>0</sub>	Absorvância do branco a 550 nm
A <sub>E</sub>	Atividade específica da enzima por massa de proteína (U mg <sup>-1</sup> )
AMG	Amiloglicosidase
ANC	Amido não convertido
C	Concentração de ciclodextrina (mmol L <sup>-1</sup> )
C <sub>F</sub>	Concentração de FLOX (mol L <sup>-1</sup> )
CD	Ciclodextrina
CD <sub>1</sub>	Soma das CDs produzidas em uma só batelada (g)
CD <sub>2</sub>	Soma das CDs produzidas em duas bateladas sequenciadas (g)
CDs	Ciclodextrinas
CD <sub>s</sub>	Massa de CDs na equação do rendimento (g)
CD <sub>sL</sub>	Massa de CDs em solução (g)
CGTase	Ciclomaltodextrina–glucano-transferase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CM <sub>CD</sub>	Concentração máxima de CD utilizada
C <sub>P</sub>	Concentração de proteínas da preparação líquida comercial de CGTase (mg mL <sup>-1</sup> )
C <sub>β-CD</sub>	Concentração de β-CD (mmol L <sup>-1</sup> )
D	Diluição da amostra
DE	Dextrose equivalente
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Eficiência de complexação
FLOX	Enrofloxacina
Glic	Glicose
I	Inclinação da reta obtida no diagrama de solubilidade
<i>k</i>	Constante de equilíbrio da formação do complexo β-CD/PHE
K	Constante de estabilidade do complexo formado
L	Distância que a luz percorre na cubeta contendo a solução (cm)
Ma	Massa de amido na equação do rendimento (g)
MCFE	Método colorimétrico da fenoltaleína
n	Número de vezes que a solubilidade aumenta com a adição da CD

$P_1$	Precipitado resultante da primeira batelada
$P_2$	Precipitado contendo a CGTase adsorvida após a primeira batelada
$P_3$	Precipitado resultante da segunda batelada
$P_4$	Precipitado resultante da recuperação de $P_1$
$P_5$	Precipitado resultante da recuperação de $P_3$
$P_{c1}$	Primeiro precipitado cristalizado
$P_{c2}$	Segundo precipitado obtido a partir da cristalização do sobrenadante $S_2$
$P_p$	Precipitado contendo as CDs cristalizadas
$P_{pt}$	Precipitado resultante do pré-tratamento dos grânulos de amido
$P_{rc1}$	Precipitado obtido com a primeira recristalização a partir do precipitado $P_{c1}$
$P_{rc2}$	Precipitado obtido com a segunda recristalização a partir do precipitado $P_{c1}$
$P_{rc3}$	Precipitado obtido com a terceira recristalização a partir do precipitado $P_{c1}$
$R$	Coefficiente de correlação das retas ajustadas
$R_a$	Rendimento de CDs produzidas (em solução) em relação ao amido utilizado (%)
$R_{a\beta}$	Rendimento de $\beta$ -CD produzida em relação ao amido utilizado (%)
$R_{aCDs}$	Rendimento de CDs produzidas em relação ao amido utilizado (%)
$R_{bu}$	Aumento no rendimento do processo com duas bateladas sequenciadas em relação ao processo com batelada única (%)
$S$	Sobrenadante resultante da primeira cristalização
$S_0$	Quantidade de FLOX que é solúvel na ausência da CD
$S_1$	Sobrenadante resultante da primeira batelada
$S_2$	Sobrenadante contendo as CDs da 1ª batelada, após adsorção da CGTase
$S_3$	Sobrenadante resultante da segunda batelada
$S_4$	Sobrenadante obtido após a recuperação de $P_1$
$S_5$	Sobrenadante obtido após a recuperação de $P_3$
$S_{max}$	Máxima concentração de FLOX obtida no filtrado após a adição da CD
$S_{pt}$	Sobrenadante resultante do pré-tratamento dos grânulos de amido
$t$	Tempo de reação (min)
$V_E$	Volume de enzima utilizada (mL)
$V_R$	Volume reacional (mL)
1B	Processo com uma batelada
1B-SE	Processo com uma batelada sem etanol
2B	Processo com duas bateladas sem pré-tratamento do amido para a segunda batelada

2BP	Processo com duas bateladas com pré-tratamento do amido para a segunda batelada
2BP-SE	Processo com duas bateladas com pré-tratamento do amido para a segunda batelada, sem etanol
$\beta$ CD	Massa de $\beta$ -CD na equação do rendimento (g)
$\Delta C/\Delta t$	Coefficiente angular da região linear na curva de concentração versus tempo ( $\text{mmol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
$\varepsilon$	Absortividade molar específica da FLOX (unidades de absorção $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1	Ciclodextrinas.....	4
2.1.1	Estrutura e características físico-químicas das ciclodextrinas.....	5
2.1.2	Produção de ciclodextrinas.....	9
2.1.2.1	Influência do tempo de reação – método das velocidades iniciais.....	13
2.1.2.2	Substratos para a produção de ciclodextrinas.....	13
2.1.2.3	Enzima CGTase e seu mecanismo de ação.....	20
2.1.2.4	Processos para a produção de ciclodextrinas.....	23
2.1.3	Separação e purificação de ciclodextrinas.....	25
2.1.3.1	Separação da $\beta$ -ciclodextrina por cristalização.....	25
2.1.3.2	Precipitação de ciclodextrinas por solventes orgânicos.....	27
2.1.3.3	Cromatografia/adsorção na purificação de ciclodextrinas.....	29
2.1.3.4	Separação de ciclodextrinas por membranas e técnicas de filtração.....	32
2.1.4	Aplicação das ciclodextrinas em fármacos.....	35
2.1.4.1	Caracterização de complexos em solução - Diagramas de solubilidade de fases.....	37
2.1.4.2	Obtenção e caracterização dos complexos de inclusão.....	39
2.1.4.2.1	Obtenção dos complexos – Método kneading.....	39
2.1.4.2.2	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	39
2.1.4.2.3	Termogravimetria (TGA).....	40
2.1.4.3	Aspectos biofarmacêuticos.....	40
2.2	Enrofloxacin.....	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS – PARTE 1.....	46

3.1	Materiais.....	46
3.1.1	Substratos.....	46
3.1.2	Enzimas.....	46
3.1.3	Reagentes analíticos.....	46
3.1.4	Reator.....	47
3.1.5	Equipamentos.....	47
3.2	Métodos.....	48
3.2.1	Determinação do teor de proteína da enzima.....	48
3.2.2	Determinação de glicose.....	49
3.2.3	Determinação da $\beta$ -ciclodextrina pelo método colorimétrico da fenolftaleína.....	50
3.2.4	Determinação das ciclodextrinas por cromatografia líquida de alta eficiência.....	51
3.2.5	Preparação da suspensão de amido.....	52
3.2.6	Determinação das condições de trabalho.....	52
3.2.6.1	Procedimento de inativação, centrifugação e análise das amostras coletadas.....	52
3.2.6.2	Temperatura, pH e concentração de substrato.....	53
3.2.6.3	Concentrações de Toruzyme® e etanol a serem utilizadas na produção de CDs.....	53
3.2.6.4	Fração do amido pré-tratado que sofre a ação da Toruzyme®.....	54
3.2.7	Determinação da atividade da CGTase pelo método das velocidades iniciais.....	55
3.2.8	Produção de CDs por batelada única e separação da $\beta$ -CD produzida, por cristalização e precipitação.....	55
3.2.9	Produção de CDs em bateladas sequenciadas.....	59
3.2.10	Produção de CDs em bateladas sequenciadas, com posterior separação da $\beta$ -CD por cristalização.....	63
3.2.11	Recristalização da $\beta$ -CD.....	63
3.2.11.1	Ensaio com recristalização a partir de um processo de produção de CDs com batelada única.....	64



3.2.11.2	Ensaio com recristalizações de precipitados produzidos a partir de processos com bateladas sequenciadas .....	66
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 1 .....	67
4.1	Curvas de calibração .....	67
4.1.1	Dosagem de Proteína pelo Método de Bradford .....	67
4.1.2	Determinação de glicose pelo método GOD-POD .....	67
4.1.3	Determinação da $\beta$ -ciclodextrina pelo método colorimétrico da fenolftaleína.....	68
4.1.4	Determinação das ciclodextrinas por cromatografia líquida de alta eficiência.....	69
4.2	Determinação das condições de trabalho .....	69
4.2.1	Fração do amido pré-tratado que sofre a ação da Toruzyme® .....	71
4.2.2	Variação da concentração de enzima com etanol a 15 % (v/v).....	71
4.2.3	Variação da concentração de etanol com enzima a 0,1 % (v/v).....	73
4.2.4	Variação da concentração de enzima com etanol a 10 % (v/v).....	76
4.3	Determinação da atividade da CGTase pelo método das velocidades iniciais .....	76
4.4	PRODUÇÃO DE cds COM BATELADA ÚNICA E Separação da $\beta$ -CD produzida por cristalização e precipitação .....	78
4.5	Produção de CDs em bateladas sequenciadas .....	79
4.6	Produção de CDs em bateladas sequenciadas com posterior separação da $\beta$ -CD por cristalização .....	83
4.7	Recristalização da $\beta$ -CD.....	85
4.7.1	Ensaio com recristalizações sucessivas a partir de um processo de produção de CDs com batelada única .....	85
4.7.2	Ensaio com recristalizações de precipitados produzidos a partir de processos com bateladas sequenciadas .....	89
5	CONCLUSÕES – PARTE 1 .....	93
6	MATERIAIS E MÉTODOS – PARTE 2.....	96

6.1	Materiais.....	96
6.1.1	Reagentes .....	96
6.1.2	Equipamentos.....	96
6.2	Métodos.....	97
6.2.1	Solubilidade da enrofloxacin pura.....	97
6.2.2	Verificação da linearidade da análise espectrofotométrica para a enrofloxacin .	98
6.2.3	Influência da $\beta$ -CD sobre o espectro de absorvância de uma solução de enrofloxacin.....	98
6.2.4	Solubilidade da enrofloxacin na presença de ciclodextrinas.....	99
6.2.5	Solubilidade da enrofloxacin na presença de ácido cítrico .....	101
6.2.6	Solubilidade da enrofloxacin na presença de ácido cítrico e $\beta$ -CD.....	102
6.2.7	Análises de DSC e TGA .....	103
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 2.....	104
7.1	Solubilidade da ENROFLOXACINA Pura.....	104
7.2	Verificação da linearidade da análise espectrofotométrica da ENROFLOXACINA ... .....	105
7.3	Influência da $\beta$ -CD sobre o espectro de absorvância DA solução de ENROFLOXACINA.....	107
7.4	Solubilidade da ENROFLOXACINA na presença de ciclodextrinas.....	109
7.4.1	Diagrama de solubilidade da enrofloxacin com adição de $\alpha$ -CD .....	109
7.4.2	Diagrama de solubilidade da enrofloxacin com adição de $\beta$ -CD.....	111
7.4.3	Diagrama de solubilidade da enrofloxacin com adição de $\gamma$ -CD .....	113
7.4.4	Diagrama de solubilidade da enrofloxacin com adição de HP- $\beta$ -CD .....	115
7.4.5	Comparação das diferentes ciclodextrinas.....	116
7.5	Solubilidade da ENROFLOXACINA na presença de ácido cítrico .....	119
7.6	Solubilidade da ENROFLOXACINA na presença de ácido cítrico e $\beta$ -CD.....	119

7.7	Caracterização dos complexos de inclusão .....	122
7.7.1	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	123
7.7.2	Termogravimetria (TGA).....	125
8	CONCLUSÕES – PARTE 2 .....	127
	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	128
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	129
	REFERÊNCIAS .....	130
	PUBLICAÇÕES E APRESENTAÇÕES EM EVENTOS.....	139

## 1 INTRODUÇÃO

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos em forma de cone truncado que têm a capacidade de formar complexos de inclusão com moléculas apolares, causando alterações nas propriedades físicas e químicas das moléculas hóspedes. As CDs são formadas por unidades de D-anidroglicano-piranoose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1-4 e são produzidas pela ação da enzima ciclomaltodextrina-glicano-transferase (CGTase) sobre o amido. As mais comuns são constituídas de 6, 7 ou 8 unidades de D-anidroglicano-piranoose, sendo denominadas de  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, respectivamente. A  $\beta$ -CD é a menos solúvel das três CDs, portanto, a sua separação do meio reacional é geralmente mais simples, podendo ser feita por cristalização (BIWER *et al.*, 2002; SZEJTLI, 2004; TARDIOLI *et al.*, 2006).

A  $\beta$ -CD é a mais empregada pois, apesar da reduzida solubilidade aquosa limitar sua aplicação, apresenta uma capacidade de complexação de um elevado número de fármacos hidrófobos, está disponível em elevadas quantidades e a baixo custo, e o seu uso está aprovado como excipiente para preparações farmacêuticas. Na realidade, a  $\beta$ -CD é a CD presente na maior parte das formulações existentes no mercado (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Ciclodextrinas com mais de oito unidades são conseguidas com baixo rendimento e receberam maior atenção a partir de trabalhos que mostraram sua habilidade em formar novos complexos, com propriedades não disponíveis para as CDs menores, como a capacidade de auxiliar no dobramento e montagem final de estruturas de proteínas (chaperonas artificiais), podendo também encontrar aplicações como novos compostos hospedeiros nos processos de reconhecimento molecular em nanobiotecnologia. Uma CD com cinco unidades de D-anidroglicano-piranoose (ciclomaltopentaose) foi quimicamente sintetizada por Nakagawa *et al.* em 1994, mas as propriedades físico-químicas e capacidade de formação de complexos de inclusão não foram ainda relatadas (ENDO e UEDA, 2004, QI *et al.*, 2007).

As ciclodextrinas apresentam muitas aplicações, tais como: na indústria química, como catalisadores, inibidores de reações e em aplicações cromatográficas; na indústria de alimentos, para a adição de vitaminas e aditivos sob a forma de complexos de inclusão; na agricultura, como estabilizantes de fungicidas; na indústria farmacêutica, para aumentar a estabilidade de moléculas incluídas contra a hidrólise, oxidação, fotodecomposição e desidratação, corrigir odor e sabor desagradável do fármaco, e aumentar sua solubilidade e biodisponibilidade (SZEJTLI, 2004, SÁ BARRETO e CUNHA-FILHO, 2008). Sua

capacidade de formar complexos estáveis com várias moléculas orgânicas, inorgânicas, biológicas e com íons, também as torna atraentes como blocos para a construção de sistemas supramoleculares em nano-escala, especialmente materiais bioativos (CHEN e LIU, 2010).

O etanol pode ser uma importante ferramenta na produção de CDs, por ser praticamente inofensivo e um aditivo que pode facilmente ser evaporado e reutilizado. Além disso, sua presença reduz a possibilidade de ocorrerem contaminações microbianas durante o processo. O etanol exclui moléculas de água do centro ativo da enzima, prevenindo reações hidrolíticas, bem como as reações reversas, e desta forma retarda a decomposição da CD formada (MATTSSON *et al.*, 1991).

No Brasil há uma grande motivação para o estudo de métodos de produção de CDs, já que há uma disponibilidade do substrato amido, a baixo custo, o que torna atraente a perspectiva de produção de CDs que são produtos de alto valor agregado (BERTOLINI *et al.*, 1998).

Assim, o **primeiro objetivo** deste trabalho foi desenvolver uma tecnologia alternativa e inovadora para a produção de CDs que propicie o aproveitamento do amido não reagido, assim como da enzima que ainda está ativa após o processo em uma única batelada. Constituíram os objetivos específicos:

- a) Estudar a produção de CDs a partir do amido de milho e do amido de mandioca, com a enzima CGTase, na presença de etanol;
- b) Produzir CDs em bateladas sequenciadas na presença de etanol. Esse processo permitiria, em princípio, a recuperação parcial da enzima CGTase por adsorção em novos grânulos de amido após o primeiro ciclo, levando a um maior rendimento de CDs a partir de uma mesma quantidade de CGTase;
- c) Estudar a separação da  $\beta$ -CD por cristalização, uma vez que a metodologia para essa etapa do processo de produção dessa CD não está disponível no Brasil.

A inclusão molecular de princípios ativos na área farmacêutica é sem dúvida uma das aplicações das CDs mais visadas. Muitos trabalhos demonstram as diversas aplicações em termos de modificação das características físico-químicas intrínsecas das moléculas hóspedes. Fármacos pouco solúveis em água apresentam, em geral, problemas de biodisponibilidade, sendo a dissolução o fator limitante para a absorção dos mesmos (GRILLO *et al.*, 2008).

A enrofloxacin (FLOX) é um agente antibacteriano sintético da classe das fluorquinolonas, usado exclusivamente em medicina veterinária. Este fármaco se caracteriza

por uma boa atividade antimicrobiana e um amplo espectro de ação contra uma extensa classe de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Apresenta-se na forma de cristais de cor amarelo-pálido, pouco solúveis em água e solúveis em soluções acidificadas com ácidos minerais diluídos (VALGAS, 2005). Uma vez que o gosto amargo limita a aceitação das formulações orais baseadas na enrofloxacin, o mascaramento do gosto é essencial para a melhoria da efetividade terapêutica (CHUN e CHOI, 2004).

Devido ao sabor amargo da FLOX, que causa rejeição das formulações contendo este antibiótico, e à sua baixa solubilidade em água, a empresa brasileira Formil Química Ltda, localizada em Barueri (SP), manifestou interesse no estudo da inclusão deste medicamento em CDs, motivando esta pesquisa.

O estudo da viabilidade de produção do complexo de inclusão do antibiótico FLOX em CDs e o estudo das características do produto, como a solubilidade e a constante de estabilidade de formação do complexo CD/FLOX, constituíram o **segundo objetivo** deste trabalho. Os objetivos específicos neste caso foram:

- a) Determinar o espectro de absorção da FLOX, da  $\beta$ -CD e de misturas dessas substâncias em solução aquosa, de forma a investigar a formação do complexo;
- b) Obter o diagrama de fase para a solubilidade da FLOX em água, na presença de CDs, com a finalidade de se determinar o aumento de solubilidade do complexo CD/FLOX à medida que se aumenta a concentração da CD;
- c) Determinar a constante de estabilidade de formação do complexo CD/FLOX, se formado;
- d) Testar o ácido cítrico como coadjuvante na formação do complexo, que no caso de outras substâncias já testadas para a inclusão em CDs, contribuiu significativamente para aumentar a solubilidade da substância incluída.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Como o trabalho apresenta dois objetivos distintos, a revisão bibliográfica abordará os assuntos pertinentes às duas partes do trabalho, primeiramente para a produção e separação de ciclodextrinas (CDs) e na sequência, para a formação de complexos de inclusão da enrofloxacina (FLOX) com ciclodextrinas.

### 2.1 CICLODEXTRINAS

O Grupo de Processos Biotecnológicos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá estabeleceu a partir de 1990, uma linha de pesquisas associada à produção de CDs, abordando desde a produção e purificação de uma CGTase a partir do *Bacillus firmus* cepa nº 37, com o estudo dos parâmetros que influenciam na sua produção e o estudo das propriedades desta enzima, até estudos tais como: produção de  $\beta$ -CD por fermentação e ciclização simultâneas; produção de CDs em reator de leito fluidizado; imobilização da CGtase em diversos suportes com diferentes metodologias; e aplicação das CDs como agentes complexantes de fármacos, aminoácidos e produtos veterinários. Uma ampla revisão bibliográfica descrevendo a síntese da enzima CGTase e as CDs sob os mais diversos aspectos tais como, propriedades físicas, aplicações, meios de produção e toxidez, pode ser encontrada em trabalhos do grupo: dissertações de mestrado (LIMA, 1996; SILVA, 1998; TARDIOLI, 1998; OLIVEIRA, 2000; ALVES, 2002; SOBRAL, 2002; BERGAMASCO, 2003; SOUZA, 2003; MARQUES, 2004; WATANABE, 2005; BARÃO, 2008; BONETTI, 2009) e teses de doutorado (MATIOLI, 1997; BERGAMASCO, 2007; LINDE, 2008). Além disso, artigos de revisão (HAMILTON *et al.*, 2000; BIWER *et al.* 2002; DEL VALLE, 2004; SZEJTLI, 2004; SZENTE e SZEJTLI, 2004; QI e ZIMMERMANN, 2005; SZEJTLI, 2005; BREWSTER e LOFTSSON, 2007; CUNHA FILHO e SÁ BARRETO, 2007; LI *et al.*, 2007; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007; SÁ BARRETO e CUNHA-FILHO, 2008; STELLA e HE, 2008; van de MANAKKER *et al.*, 2009; CHEN e LIU, 2010; TIWARI *et al.*, 2010) e livros (SZEJTLI, 1988; FRÖMMING e SZEJTLI, 1994; MATIOLI *et al.*, 2000) relatam detalhadamente esse assunto. Assim, nessa revisão bibliográfica sobre esses compostos, procurou-se abordar apenas os aspectos mais relevantes ao desenvolvimento do trabalho.

### 2.1.1 Estrutura e características físico-químicas das ciclodextrinas

As CDs, representadas nas Figuras 2.1 e 2.2, são oligossacarídeos cíclicos, não redutores, formados por unidades de D-anidroglicano-piranosose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1-4. As CDs mais comuns são constituídas de 6, 7 ou 8 unidades de D-anidroglicano-piranosose, sendo denominadas de  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, respectivamente (BIWER *et al.*, 2002). Possuem a forma tronco-cônica, com a superfície externa hidrofílica (hidroxilas primárias e secundárias), e a cavidade interna hidrofóbica (grupos C-H e oxigênios glicosídicos), permitindo que incluam, em escala molecular, uma variedade de moléculas apolares. A inclusão normalmente confere à molécula complexada maior estabilidade física e química, às vezes aumentando sua solubilidade. Essas propriedades criam a oportunidade para muitas aplicações industriais das CDs em alimentos, cosméticos, fármacos, produtos agrícolas, separações cromatográficas, processos biotecnológicos (tais como cultivo de células, fermentações, produção de vacinas e antibióticos) e muitas outras (FRÖMMING e SZEJTLI, 1994; SZEJTLI, 1990; TARDIOLI, 2004).

Devido ao tamanho da cavidade, a  $\alpha$ -CD está limitada a complexar moléculas de pequeno tamanho ou com cadeias laterais alifáticas, enquanto a  $\beta$ -CD é apropriada para complexar anéis aromáticos. A  $\gamma$ -CD com uma cavidade maior, adequa-se à complexação de moléculas grandes como esteróides ou antibióticos macrólidos (que se caracterizam por ter um anel macrocíclico de 14 a 16 carbonos) (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

As CDs são substâncias cristalinas, homogêneas, não redutoras, hidrossolúveis e não higroscópicas. Suas dimensões são determinadas pelo número de unidades de D-anidroglicano-piranosose. Devido à diferença do diâmetro da cavidade interna, cada ciclodextrina mostra uma capacidade diferente de formação do complexo de inclusão, com diferentes tamanhos de moléculas hóspedes (FRÖMMING e SZEJTLI, 1994). Algumas importantes propriedades físico-químicas desses compostos são descritas na Tabela 2.1.



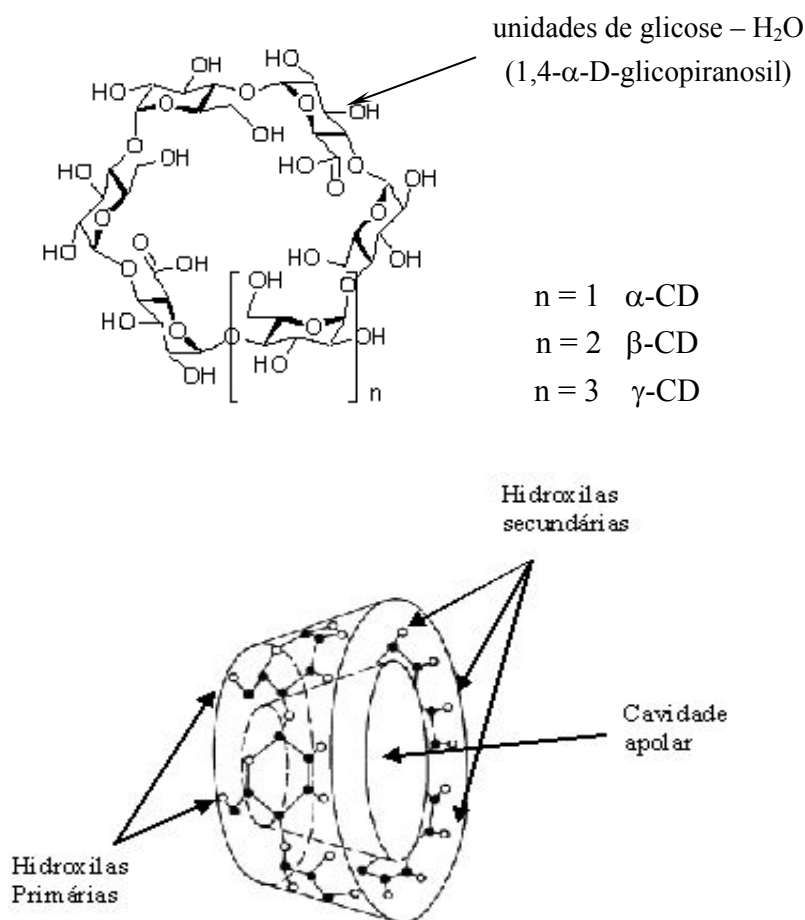


Figura 2.1 – Representação esquemática da estrutura das CDs (LOFTSSON *et al.*, 2005, figuras modificadas por SÁ BARRETO e CUNHA-FILHO, 2008).

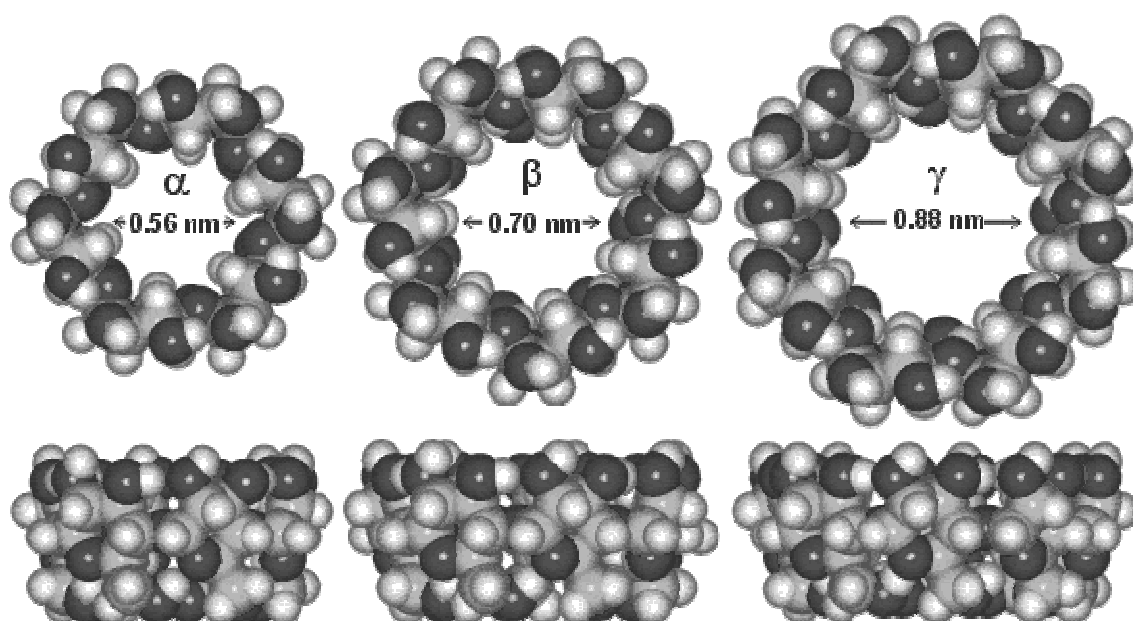


Figura 2.2 – Modelo tridimensional das CDs, com apresentação dos átomos de carbono (cinza), hidrogênio (cinza claro-branco) e oxigênio (preto) (CHAPLIN, 2009).

**Tabela 2.1 – Propriedades físico-químicas da  $\alpha$ -  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD (FRÖMMING e SZEJTLI, 1994; SZEJTLI, 1988; TARDIOLI, 1998).**

Parâmetro	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Unidades de D-anidroglucano-piranosose	6	7	8
Massa molecular	972	1135	1297
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Altura do tronco (Å)	7,9 $\pm$ 0,1	7,9 $\pm$ 0,1	7,9 $\pm$ 0,1
Diâmetro externo do tronco (Å)	14,6 $\pm$ 0,4	15,4 $\pm$ 0,4	17,5 $\pm$ 0,4
Volume da cavidade (Å <sup>3</sup> )	174	262	427
Número de moléculas de água na cavidade	6	11	17
Ponto de fusão (°C)	275	280	275
pKa (por potenciometria) a 25 °C	12,3	12,2	12,1
Forma dos cristais	Placas hexagonais	Paralelogramos monoclinicos	Prismas quadráticos
Hidrólise por $\alpha$ -amilase de <i>A. oryzae</i>	Desprezível	Lenta	Rápida

A solubilidade das CDs em água aumenta rapidamente com a elevação da temperatura, o que permite uma recristalização fácil quando a temperatura é reduzida. Em solução aquosa, as cavidades das CDs não são espaços vazios, pois algumas moléculas de água ficam contidas nas cavidades, enquanto outras formam parte integrante da estrutura cristalina. Os complexos de inclusão das CDs são formados pela substituição da água inclusa por moléculas hóspedes adequadas. A solubilidade das CDs em água difere significativamente, como pode ser verificado na Tabela 2.2: A  $\alpha$ -CD e a  $\gamma$ -CD têm solubilidade relativamente alta enquanto a  $\beta$ -CD é bem menos solúvel em água (FRÖMMING e SZEJTLI, 1994; MATIOLI *et al.*, 2000), aparentemente porque a  $\beta$ -CD tem uma estrutura cristalina mais rígida, em função da localização mais apropriada das ligações intermoleculares de hidrogênio (como na celulose), juntamente com um melhor ajuste à estrutura da molécula de água e conseqüente menor entropia de hidratação, que são responsáveis pela baixa solubilidade da  $\beta$ -CD (CHAPLIN, 2009).

Uma das propriedades marcantes das CDs é sua notável resistência às enzimas que hidrolisam o amido. Elas são completamente resistentes à  $\beta$ -amilase, pois não contêm grupos suscetíveis ao ataque dessa enzima. As  $\alpha$ -amilases, que não exigem grupos terminais livres, são capazes de hidrolisar as CDs: a  $\gamma$ -CD é mais flexível e facilmente hidrolisada pelas  $\alpha$ -amilases enquanto a  $\alpha$ -CD é mais rígida e pouco hidrolisada. Os grupos hidroxila podem ser

derivatizados para modificar a especificidade e as propriedades físicas e químicas das CDs (SZEJTLI, 1988; CHAPLIN, 2009).

**Tabela 2.2 – Solubilidade das CDs em água, em várias temperaturas (FRÖMMING e SZEJTLI, 1994).**

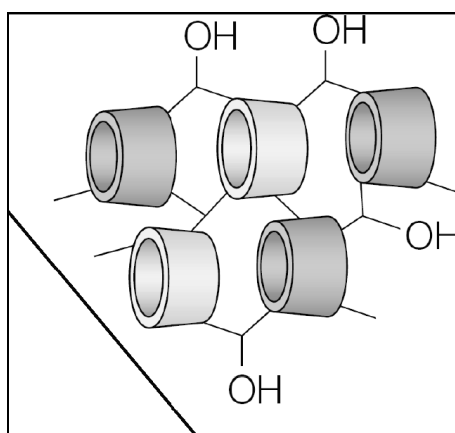
T (°C)	Solubilidade em água (mg g <sup>-1</sup> )		
	α-CD	β-CD	γ-CD
20	90	16,4	185
25	127	18,8	256
30	165	22,8	320
35	204	28,3	390
40	242	34,9	460
45	285	44,0	585
50	347	52,7	-
55	-	60,5	-
60	-	74,9	-
65	-	101,8	-
70	-	120,3	-
75	-	148,0	-
80	-	196,6	-

Uma mesma CD pode ocorrer em várias formas de arranjo cristalino. Por exemplo, o hidrato de β-CD tem duas formas de arranjo: β-CD-12H<sub>2</sub>O e β-CD-11H<sub>2</sub>O. As CDs têm sabor doce e a viscosidade de suas soluções aquosas não difere significativamente da viscosidade da água. Como os demais oligo e polissacarídeos não redutores, as CDs são estáveis em meio alcalino. Por outro lado, a sua hidrólise ácida parcial produz uma série de malto-oligossacarídeos e glicose. Contudo, a resistência à hidrólise ácida das CDs é de 3 a 5 vezes maior (dependendo da temperatura e da acidez) do que das dextrinas lineares correspondentes (MATIOLI *et al.*, 2000). Para romper a estrutura da β-CD, condições de alta temperatura e forte acidez são necessárias (taxa de 15 % de hidrólise por hora a 60 °C em HCl 1 mol L<sup>-1</sup>) (ROQUETTE-PHARMA, 2010).

Devido à capacidade das CDs de formarem complexos de inclusão, elas têm sido frequentemente utilizadas na concepção de materiais poliméricos, como hidrogéis e

nanopartículas, que apresentam características únicas em termos de propriedades mecânicas, estímulo-resposta e de liberação da substância complexada. Uma representação esquemática de uma ligação cruzada de  $\beta$ -CD usando epícloridrina como um agente bifuncional de ligação, em meio alcalino, resultando em um hidrogel polimérico está apresentada na Figura 2.3. Vários estudos mostraram a capacidade dessas redes de complexar uma grande variedade de fármacos pouco solúveis em água (van de MANAKKER *et al.*, 2009).

Ciclodextrinas contendo 9 a 13 unidades de D-anidroglucano-piranoose já foram reportadas. Muitas CDs modificadas foram desenvolvidas com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas e a capacidade de complexação das CDs naturais. A derivatização química pode transformar as CDs cristalinas em estruturas amorfas incrementando a solubilidade dessas moléculas. Embora muitas demonstraram ter aplicações na pesquisa, apenas algumas têm sido comercialmente usadas como novos excipientes farmacêuticos, que são aquelas contendo hidroxipropila (HP), metila (M) e sulfobutil-éter (SBE) como substituintes (OLIVEIRA *et al.*, 2009; TIWARI *et al.*, 2010).



**Figura 2.3 – Representação esquemática do polímero  $\beta$ -CD-epícloridrina (van de MANAKKER *et al.*, 2009).**

### 2.1.2 Produção de ciclodextrinas

O amido é um polímero da glicose que é sintetizado em grande quantidade por muitos vegetais superiores. Tem baixo custo no Brasil ( $\sim 0,5$  USD  $\text{kg}^{-1}$ ) e pode ser empregado como matéria-prima para a produção das ciclodextrinas, que são produtos com alto valor agregado. O menor preço é praticado para a  $\beta$ -CD e o maior para a  $\gamma$ -CD. De acordo com Brewster e Loftsson (2007), os preços variam de 45 USD  $\text{kg}^{-1}$  para a  $\alpha$ -CD, 5 USD  $\text{kg}^{-1}$  para a  $\beta$ -CD e

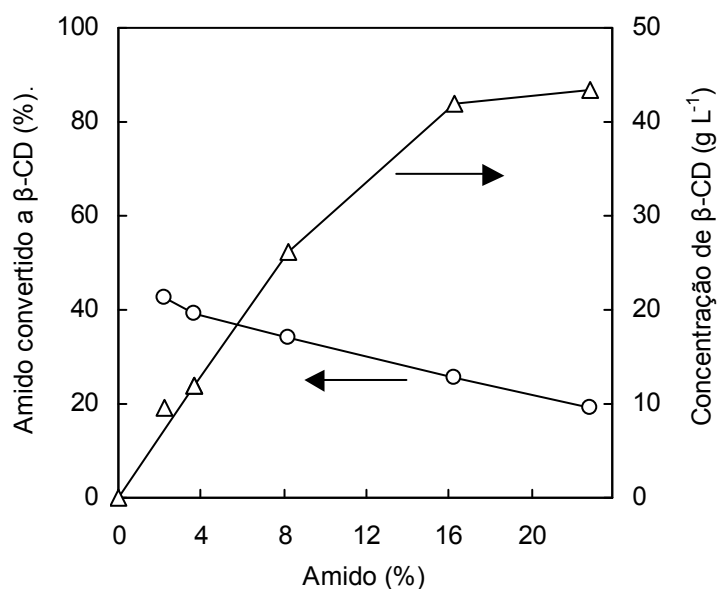
80 USD kg<sup>-1</sup> para a  $\gamma$ -CD. Os preços citados referem-se ao produto a granel e refletem, de um lado, a facilidade de produção industrial da  $\beta$ -CD, e de outro, a dificuldade no caso da  $\gamma$ -CD.

A produção de ciclodextrinas é complicada por vários fatores que influenciam o processo, como por exemplo (BIWER *et al.* 2002; FRÖMMING e SZEJTLI, 1994; PISHTIYSKI e ZHEKOVA, 2006):

- Uma cinética enzimática extremamente complexa, com a ocorrência de reações inversas que limitam a conversão do substrato.
- O produto da reação contém uma mistura complexa de maltodextrinas lineares e ciclodextrinas, que precisam, em geral, ser separadas.
- A enzima sofre inibição pelos oligossacarídeos de baixa massa molecular, particularmente da maltose e glicose, bem como de determinados íons e substâncias orgânicas, cuja influência precisa ser conhecida.
- Maiores concentrações do substrato, amido hidrolisado, reduzem a conversão com relação às ciclodextrinas.
- Quase a totalidade das enzimas conhecidas produz maior quantidade de  $\alpha$ -CD ou  $\beta$ -CD, principalmente esta última.
- Os rendimentos em geral são muitos baixos e normalmente não ultrapassam 25 % de conversão do substrato em ciclodextrinas.
- O uso de determinadas moléculas hóspedes que formam complexos com um determinado tipo de ciclodextrina, reduz a intensidade das reações reversas, e aumenta a seletividade da produção daquela CD em particular. No entanto, são raras as moléculas que podem ser aplicadas na produção industrial, tanto pela dificuldade da formação de um complexo de elevada constante de associação, quanto pela exigência de que a molécula hóspede seja atóxica.

O dilema econômico do processo de produção de ciclodextrinas onde o acréscimo na concentração de substrato provoca um aumento na produtividade volumétrica do reator, porque aumenta a concentração de  $\beta$ -CD, porém reduz a conversão do amido em CDs, pode ser verificado na Figura 2.4. O rendimento em  $\beta$ -CD baseado na concentração de amido de batata decresce de 43 % quando a concentração de amido é 2,3 %, para 19 % quando a concentração de amido é 22,6 %. Já o rendimento em  $\beta$ -CD por unidade de volume do reator, aumenta de 9,9 g L<sup>-1</sup> para 43 g L<sup>-1</sup> com o mesmo aumento na concentração de amido. O baixo

rendimento para altas concentrações de amido deve-se à inibição da enzima pela formação de CDs, principalmente da  $\beta$ -CD. A remoção dessa ciclodextrina do meio reacional por ultrafiltração, precipitação ou formação de complexos de inclusão aumenta o rendimento do processo (BERGSMA *et al.*, 1988).

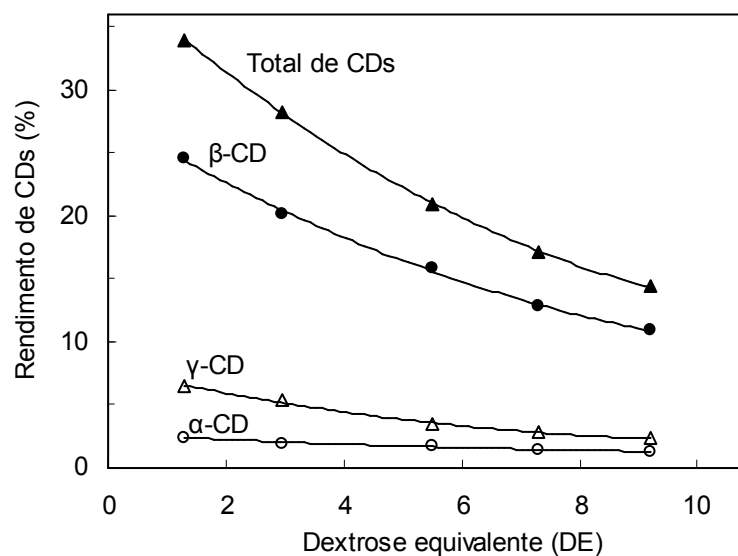


**Figura 2.4 – Efeito da concentração do amido de batata no rendimento da produção de  $\beta$ -CD (adaptado de BERGSMA *et al.*, 1988).**

Na produção de ciclodextrinas emprega-se, normalmente, o amido hidrolisado, na forma de uma solução de maltodextrinas, com baixo valor de dextrose equivalente (DE). Quanto menores forem as moléculas, mais doce será a mistura e mais alta a DE. O amido tem DE zero, o da dextrose é 100 e maltodextrinas têm DE menor que 20 (THOMAS e ATWELL, 1999).

Na Figura 2.5 apresenta-se a formação de ciclodextrinas a partir do amido de batata, em que se utilizou a CGTase proveniente do *Bacillus* n° 38-2 e os autores verificaram que para DE maior que 1 houve redução no rendimento em ciclodextrinas (HORIKOSHI *et al.*, 1981b).

Lima *et al.* (1998), utilizando uma CGTase obtida de *Bacillus alkalophilic* clonado em *E. coli*, observaram que para um aumento de cerca de 6 vezes da DE do amido de mandioca hidrolisado (3,54 para 23,79), a produção de  $\beta$ -CD foi reduzida em 6 vezes, em pH 6 e 38°C.



**Figura 2.5 – Dados experimentais para a produção de ciclodextrinas, que demonstram que o rendimento para todas as CDs decresce com o aumento da DE da solução (adaptado de HORIKOSHI *et al.* (1981b)).**

Pishtiyski e Zhekova (2006), empregando o amido de milho e o de batata, conseguiram um bom rendimento em CDs para a faixa de DE de 1,9 a 3,78. A partir deste ponto, o aumento no valor da DE até 10 levou a uma redução do rendimento em CDs proporcional a esse aumento. Estes resultados confirmaram a preferência da CGTase por substratos com alta massa molecular. O menor rendimento em CDs a partir de hidrolisados de amido também pode ser devido ao efeito inibitório da maltose e glicose formadas pela ação da  $\alpha$ -amilase.

Rauf *et al.* (2008), empregando o software Design Expert (Stat-Ease Inc., Statistic made easy, Minneapolis, MN, USA, version 6.0.10), aplicaram um planejamento experimental para determinar os parâmetros significativos na produção de  $\beta$ -CD, analisando os dados por superfície de resposta. Utilizaram o amido de sagu e a CGTase Toruzyme®. Cinco fatores foram estudados: temperatura, pH, concentração de substrato, concentração de enzima CGTase e agitação. Como a partir de 67 °C esse amido é gelatinizado, a temperatura foi fixada em 65 °C e o tempo para a produção foi fixado em 4 horas. As amostras foram inativadas com HCl, centrifugadas, filtradas e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Com o modelo aplicado os autores concluíram que o pH foi o fator mais significativo e que a agitação não foi significativa. Apesar desse resultado, para manter a homogeneidade do sistema de reação, a agitação foi fixada em 200 rpm. Os autores variaram

o pH de 8 a 9, a concentração de amido de 8 a 15 % (m/v) e a concentração de enzima de 0,5 a 0,75 % (v/v). A condição ótima determinada foi pH 8,62 com tampão glicina-NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup>, concentração de amido 15 % (m/v) e concentração de enzima 0,66 % (v/v). A produção de β-CD nessas condições foi de 8,43 g L<sup>-1</sup>.

#### 2.1.2.1 Influência do tempo de reação – método das velocidades iniciais

Nas curvas de progresso da maioria das reações enzimáticas, a velocidade de reação diminui com o tempo. Vários fatores podem causar esta diminuição: **(a)** a redução da concentração do substrato, à medida que ele é convertido aos produtos e conseqüente redução da saturação da enzima; **(b)** os produtos da reação podem inibir a atividade da enzima; **(c)** a reação reversa pode tornar-se mais importante conforme a concentração de produtos aumenta; **(d)** a enzima ou uma coenzima podem sofrer inativação térmica ou pelo pH. Estes fatores podem ainda, agir ao mesmo tempo. Por esta razão, a cinética das reações enzimáticas, normalmente, não segue as equações das reações químicas homogêneas simples.

Uma vez que no início da reação os fatores mencionados não tiveram tempo de se manifestar e as condições são exatamente conhecidas, a atividade enzimática pode ser determinada a partir da velocidade inicial de reação. Para se obter a velocidade inicial é necessário apenas determinar a primeira parte da curva de progresso da reação e traçar uma tangente a ela a partir da origem. As curvas, na maioria dos casos, são praticamente lineares desde que a conversão de substrato em produto não exceda 20 % (CALSAVARA, 1998; DIXON e WEBB, 1979).

#### 2.1.2.2 Substratos para a produção de ciclodextrinas

Na produção de CDs, amidos de diferentes fontes são usados, predominantemente de milho, batata, trigo, arroz e mandioca. Dextrinas podem ser empregadas como substrato, mas sua aplicação é limitada pela influência negativa da alta dextrose equivalente (DE) no rendimento em ciclodextrinas. Um pré-tratamento físico, químico ou enzimático é recomendado para reduzir a viscosidade do amido durante o processo de produção das CDs. Tratamentos com α-amilase ou CGTase termoestável parecem ser mais adequados por possibilitarem controle da hidrólise e produção de substratos com DE apropriada



(PISHTIYSKI e ZHEKOVA, 2006).

O mercado mundial de amido está dividido em cinco matérias-primas: milho, trigo, arroz, batata e mandioca. O milho é a mais significativa, sendo utilizado em 75 % da produção mundial de amido. É a principal fonte de amido nos Estados Unidos, sendo responsável por cerca de 90 % da produção de amido do país. No que diz respeito à União Européia, o milho é responsável por aproximadamente 46 % da produção de amido. No Brasil, o setor de produção de amido de milho é responsável por 70 % da produção total de amido, sendo os restantes 30 % predominantemente provenientes de mandioca (PINTO, 2009).

O amido é um carboidrato produzido pelas plantas, constituindo-se na sua fonte de reserva; é também a maior fonte de energia para organismos não fotossintéticos. Abundante na natureza, ele é composto por dois polissacarídeos distintos: amilose e amilopectina. A amilose é um polímero linear constituído de unidades de D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e a amilopectina é um polímero altamente ramificado constituído de cadeias de amilose unidas por ligações  $\alpha$ -1,6. O amido é degradado por amilases, amiloglicosidasas, glicosidasas, pululanases e ciclomaltodextrina-glucano-transferases (HAMILTON *et al.*, 2000).

O rendimento e a seletividade na produção de ciclodextrinas dependem da escolha do substrato e do tipo de CGTase. A síntese de CDs parte do amido. Tanto a amilose quanto a amilopectina servem como substratos para a produção de CDs, mas a amilopectina fornece rendimentos mais altos que a amilose. Em escala industrial, embora os rendimentos com o amido normal sejam baixos, com a amilopectina pura o processo se torna muito caro. Na produção industrial dos países do hemisfério norte, o amido de batata é o preferido. Amidos de milho e de trigo contêm alta porcentagem de amilose e mais impurezas. Amidos de mandioca e amido de milho ceroso (geneticamente modificado) contêm quase 100 % de amilopectina e seriam ideais como substratos. No entanto, esses amidos são normalmente muito caros ou não estão disponíveis em quantidade e qualidade suficientes (BIWER *et al.*, 2002). No Brasil, o amido de mandioca é uma alternativa interessante como substrato para a produção de CDs, pois, quando comparado a outros tipos de amido, tem um baixo custo de produção e alto rendimento (MORIWAKI *et al.*, 2009).

Os grânulos de amido contêm normalmente 10 a 20 % (m/m) de umidade e pequenas quantidades de proteínas, ácidos graxos, fósforo e traços de materiais inorgânicos. O amido é

insolúvel em água fria. O poder de inchamento é uma medida da capacidade de hidratação dos grânulos de amido. Quando esses grânulos são aquecidos em água em temperaturas progressivamente maiores, eles começam a aumentar seu volume (intumescimento). Se a temperatura dessa suspensão de amido supera a temperatura de gelatinização, as ligações de hidrogênio são rompidas, as moléculas de água se ligam aos grupos hidroxila liberados e ocorre a perda da estrutura cristalina no gel expandido. Essa substância gelatinosa recebe o nome de goma ou pasta de amido. A Tabela 2.3 apresenta, para amidos de diferentes procedências, as proporções de amilose e amilopectina e a faixa de temperatura de gelatinização. O processo de gelatinização não ocorre em uma temperatura definida devido aos diferentes tamanhos dos grânulos de amido. A faixa apresentada na tabela corresponde às temperaturas em que 5, 50 e 95 % dos grânulos são gelatinizados (SWINKELS, 1985).

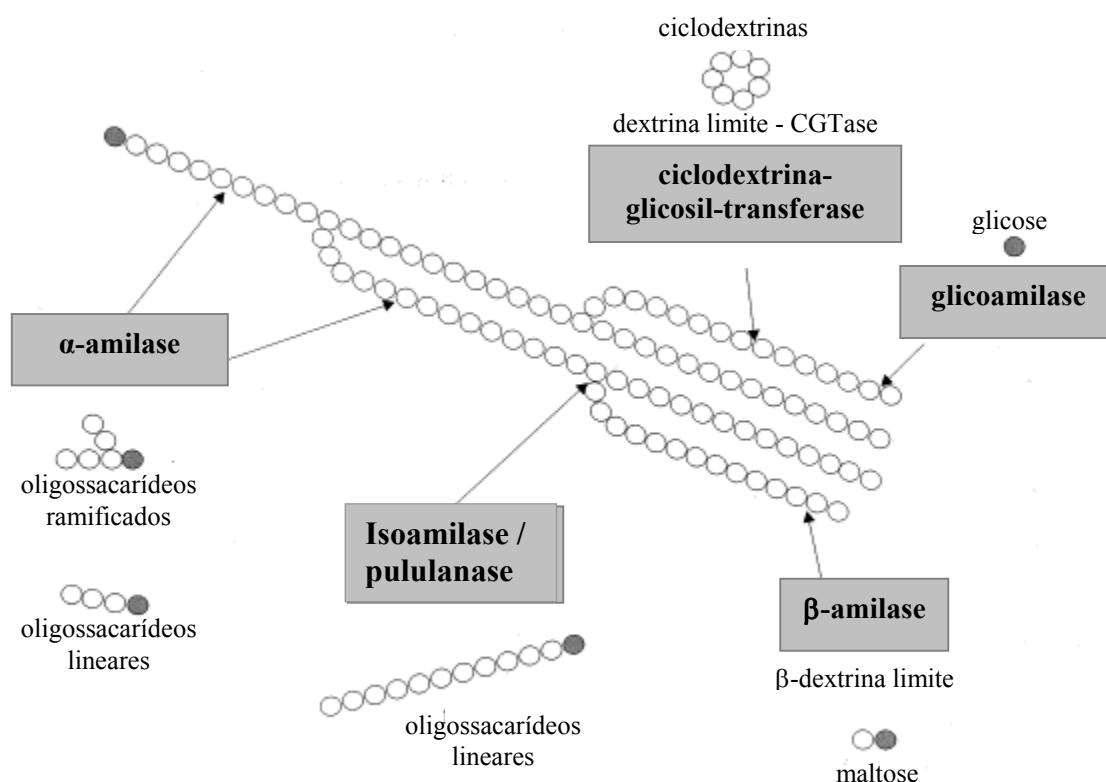
**Tabela 2.3 – Proporção de amilose e amilopectina e temperaturas nas quais 5, 50 e 95 % dos grânulos de amido de diferentes procedências são gelatinizados (SWINKELS, 1985).**

Amido	Amilose (% (m/m))	Amilopectina (% (m/m))	Temperatura de gelatinização (°C) (5-50-95 %)
Milho	28	72	62-67-72
Mandioca	17	83	59-64-69
Batata	21	79	58-63-68
Trigo	28	72	58-61-64
Arroz	17	83	68-74-78
Milho ceroso	0	100	63-68-72

A degradação enzimática do amido geralmente resulta na produção de glicose, maltose, maltotriose e malto-oligômeros de cadeias lineares ou ramificadas, conhecidas como dextrinas. Esse tipo de degradação do amido é um processo de hidrólise, onde o produto resultante provém da quebra da ligação glicosídica acompanhada da adição de uma molécula de água. Contudo, quando o amido é degradado por uma enzima do tipo glicosil-transferase (CGTase), há no produto resultante da quebra de cadeia, uma reação intramolecular sem a participação da molécula de água, de modo que produtos cíclicos conhecidos como ciclodextrinas são formados (FRÖMMING e SZEJTLI, 1994).

A Figura 2.6 apresenta a ação de diferentes enzimas sobre a molécula de amido. As  $\alpha$ -

amilases hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,4 formando oligossacarídeos lineares e ramificados. As isoamilases e pululanases produzem oligossacarídeos lineares, pois hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,6. As  $\beta$ -amilases originam unidades de maltose, enquanto as glicoamilases ( $\alpha$ -1,4-glucano-hidrolases) removem as unidades de glicose consecutivamente, hidrolisando as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6. As CGTases (ciclomaltodextrina-glucano-transferases), cujo mecanismo de ação será descrito posteriormente (item 2.1.2.3), catalisam reações de ciclização e hidrólise do amido (THOMAS e ATWELL, 1999).



**Figura 2.6 – Ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (●) Molécula de glicose com a extremidade reductora; (○) Molécula de glicose sem a extremidade reductora. As setas indicam os pontos da molécula de amido preferidos para o ataque. (Adaptada de van der VEEN *et al.*, 2000).**

Pishtyiski e Zhekova (2006) testaram diversos substratos para a produção de CDs, utilizando uma CGTase proveniente do *Bacillus megaterium*. Empregaram como substrato: dextrinas, amilose, amilopectina, maltose, glicose, amido solúvel de batata e os amidos de milho, batata e trigo. Para todos os ensaios as condições de reação foram: 40 °C, pH 6, concentração de substrato 5 % (m/v), e carga de enzima por massa de substrato equivalente a 2 U g<sup>-1</sup>. Para todos os substratos analisados o maior rendimento em ciclodextrinas ocorreu

após 20 horas de reação. As maiores conversões em CDs foram obtidas para o amido, sendo o de milho o melhor, com um rendimento de 50,9 %. As dextrinas apresentaram rendimentos duas a três vezes menores que os amidos, enquanto a glicose e a maltose apresentaram rendimentos baixíssimos (0,8-2,0 %). Nas condições de reação empregadas pelos autores a CGTase atuou eficientemente sobre o amido sem pré-tratamento, sendo que o tratamento com a  $\alpha$ -amilase não aumentou o rendimento em CDs. Alguns substratos foram pré-tratados com pululanase, mas o rendimento em CDs aumentou muito pouco (1-2 %). A CGTase é ativa em ambas as frações do amido: amilose e amilopectina. Entretanto, a produção de CDs a partir da amilose foi consideravelmente menor: cerca de 2,5 vezes em relação à amilopectina. A explicação para estes resultados pode ser encontrada na estrutura ramificada da amilopectina que permite a reação enzimática a partir de um grande número de pontos (extremidades não redutoras das cadeias laterais). Além disso, a amilopectina não tende a retrogradar-se.

Kim *et al.* (1995) estudaram o efeito do tratamento térmico de soluções de amido de milho em temperaturas de 55 a 80 °C. Empregando tratamento dessas soluções com temperatura moderada, houve uma redução na produção de maltodextrinas de baixa massa molecular e transformação do amido numa estrutura reativa para a produção de CDs. Como a temperatura de gelatinização desse amido é 72 °C, acima dessa temperatura ocorreu desintegração da sua estrutura, dificultando a separação da parte não reagida. Tratamentos abaixo de 65 °C forneceram rendimentos menores na produção de CDs. Quando o pré-tratamento foi efetuado a 65 °C por 1 hora, a estrutura do amido foi preservada e o amido não reagido pôde ser separado por um método físico como filtração ou centrifugação, após a produção de CDs. O amido não reagido pode ser utilizado posteriormente como matéria-prima de outros produtos. Das concentrações de amido e enzima testados no trabalho, os autores concluíram que a melhor condição foi para o amido na concentração de 7,5 % (m/v), carga de enzima CGTase (do *Bacillus macerans*) por massa de substrato equivalente a 48 U g<sup>-1</sup>, pré-tratamento por 1 hora a 65 °C seguido da reação por 24 horas também a 65 °C. Nessas condições, a concentração em ciclodextrinas em solução após centrifugação foi de 50 %, a conversão de substrato em CDs foi de 25 % e a produtividade de CDs foi de 5,22 mg por unidade de enzima.

Em um trabalho posterior, Kim *et al.* (1997) sugeriram que a conversão do amido numa estrutura reativa ocorre simultaneamente com a produção de CDs, eliminando assim uma etapa do processo. A reação deve ocorrer em temperatura moderada, para que não haja destruição da estrutura do amido. Utilizaram como substrato amidos de várias procedências

(trigo, milho, batata, milho com alto teor de amilose, batata doce e amido solúvel) e a enzima CGTase do microrganismo *Thermoanaerobacter sp.* produzida pela empresa Novo Nordisk Korea Ltd. Os autores observaram que, embora o rendimento em CDs tenha sido maior nas reações conduzidas a 70 e 75 °C, a pureza do produto após separação do amido não reagido foi maior quando empregaram temperaturas abaixo de 70 °C. O substrato selecionado foi o de milho, para o qual determinaram as melhores condições para um tempo de reação de 24 horas: concentração do amido 7,5 %, 65 °C, pH 6 e quantidade de enzima por massa de amido equivalente a 22 U g<sup>-1</sup>. A concentração de ciclodextrinas após centrifugação foi de 47 %, a conversão de substrato em CDs foi de 27,9 % e a produtividade em CDs foi de 12,68 mg por unidade de enzima. Comparado com o método do pré-tratamento do amido com temperatura moderada (KIM *et al.*, 1995), no qual a enzima utilizada para a reação foi de procedência diferente da empregada no trabalho anterior, esse método foi 2,4 vezes mais eficiente com base na atividade de ciclização por unidade de CGTase. Como o custo da enzima é bem maior que o do substrato e o amido residual separado por centrifugação pode ser utilizado para outros produtos, concluíram que o processo é economicamente viável.

Alves-Prado *et al.* (2008) estudaram a produção de CDs utilizando a CGTase produzida por *Bacillus clausii* E16 e como substratos maltodextrina e amido de diversas procedências (milho, mandioca, batata doce, milho ceroso e amido solúvel comercial). Os autores observaram que a procedência do substrato influenciou o tipo e a quantidade das CDs obtidas e que esta CGTase apresentou uma ação de  $\beta$ -CGTase, apresentando uma melhor conversão com o amido solúvel a 1,0 %, dos quais 80 % foram convertidos em CDs. A proporção de CDs produzidas foi 0:0,89:0,11 para  $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$ . Também observaram que os amidos provenientes de raízes e tubérculos foram mais acessíveis à CGTase do que os amidos de sementes sob as condições estudadas.

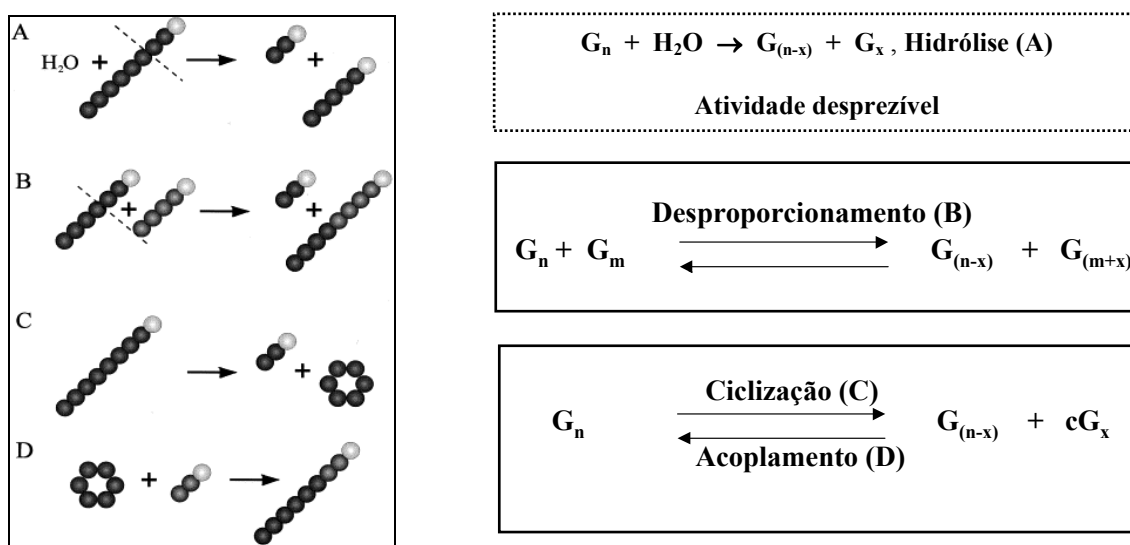
Na Tabela 2.4 apresenta-se um resumo dos substratos utilizados na produção de CDs, de acordo com o que foi discutido no item 2.1.2.2.

**Tabela 2.4 – Substratos para a produção de CDs.**

Autores	Substrato	CGTase (Microorganismo)	Processo	Resultado
Kim <i>et al.</i> (1995)	Milho 7,5% (m/v)	<i>Bacillus macerans</i>	Pré-tratamento térmico do amido 55 a 80°C, rx 12 h a 50°C, pH 6	Pré-tratamento 1h a 65°C, conversão 25%
Kim <i>et al.</i> (1997)	Trigo, milho, batata doce, batata, amido solúvel, 7,5% (m/v)	<i>Thermoanaerobacter sp.</i>	Rx. 24 h, 65°C, pH 6	Milho conversão 27,9%
Pishtiyski e Zhekova (2006)	Milho, batata, trigo e amido solúvel de batata 5% (m/v)	<i>Bacillus megaterium</i>	Substratos dissolvidos em banho a vapor rx. 24 h, 40°C, pH 6	Milho conversão 50,9%
Alves-Prado <i>et al.</i> (2008)	Milho, mandioca, batata doce, milho ceroso 2,5% (m/v) Amido solúvel e maltodextrina 1 e 2,5% (m/v)	<i>Bacillus clausii</i>	Rx. 24 h, pH 5,5, 55°C, amidos gelatinizados em autoclave	Amido solúvel 1% conversão 80%  Mandioca 2,5% conversão 22%

### 2.1.2.3 Enzima CGTase e seu mecanismo de ação

A enzima ciclomaltodextrina-glucano-transferase (EC 2.4.1.19;  $\alpha$ -1,4-glucan-4-glicosil-transferase; CGTase) catalisa reações de transglicosilação intramolecular (ciclização), transglicosilação intermolecular (acoplamento e desproporcionamento) e reações de hidrólise do amido, produzindo dextrinas lineares (Figura 2.7). A reação de ciclização refere-se à formação de ciclodextrinas; a de acoplamento (reação entre CDs e dextrinas lineares) refere-se à abertura do anel da CD, transferindo os malto-oligossacarídeos para moléculas receptoras (por exemplo, glicose); e a reação de desproporcionamento refere-se à síntese de oligômeros de massa molecular superior a seis unidades de glicose, que são usadas em seguida, na reação de ciclização, para formar CDs. Nesta reação de desproporcionamento, dois oligossacarídeos lineares são convertidos em outros dois oligossacarídeos lineares de tamanhos diferentes pelo intercâmbio de parte de uma das cadeias (TARDIOLI, 2004).



**Figura 2.7** – Reações envolvidas na cinética de produção das CDs, onde  $G_n$ ,  $G_m$  e  $G_x$  são oligossacarídeos com  $n$ ,  $m$  e  $x$  unidades de glicose, respectivamente.  $cG_x$  é a  $\alpha$ -CD para  $x = 6$ ,  $\beta$ -CD para  $x = 7$ , e  $\gamma$ -CD para  $x = 8$  (Adaptada de van der VEEN *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2010).

A reação de ciclização só é eficiente se forem empregados substratos de cadeia longa ( $DE < 20$ ). Maiores concentrações de malto-oligossacarídeos ou glicose favorecem a reação reversa, ou seja, acoplamento, resultando em produtos lineares e pequenas quantidades de CDs. A reação de desproporcionamento ocorre principalmente no estágio inicial da reação enzimática, quando se utiliza substratos com cadeias longas, o que pode ser observado pela

brusca redução na viscosidade da solução do substrato (amido, por exemplo). Se as cadeias de comprimento ótimo são produzidas pela reação de desproporcionamento, a reação de ciclização predomina. A reação de desproporcionamento não influencia a síntese de CDs (TARDIOLI, 1998).

A massa molecular das CGTases varia de 60 a 110 kDa. Suas propriedades dependem fortemente do microrganismo do qual são provenientes. Atualmente, muitas CGTases são produzidas por microrganismos geneticamente modificados e muitos processos utilizando CGTases termoestáveis são relatados na literatura. Benefícios no emprego de processos a altas temperaturas incluem riscos reduzidos de contaminação, aumento na taxa de conversão enzimática, menor viscosidade e maior solubilidade dos substratos (BIWER *et al.*, 2002).

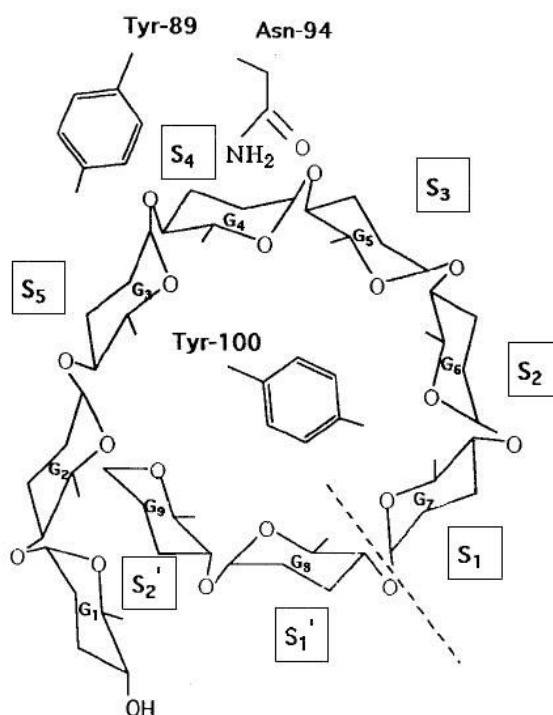
Todas as CGTases produzem uma mistura de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CDs a partir do amido, mas a proporção entre as três CDs varia com a fonte da CGTase. Enzimas de *Bacillus macerans*, *B. stearothermophilus* e *Klebsiella oxytoga* produzem principalmente  $\alpha$ -CD. Enzimas de *Bacillus circulans* e *B. megaterium* produzem principalmente  $\beta$ -CD, e *B. subtilis* N° 313 produz predominantemente  $\gamma$ -CD (KITAHATA e OKADA, 1982; LEE *et al.*, 1992; KATO e HORIKOSHI, 1986; YAGI *et al.*, 1986). Tem sido proposto que o centro ativo da CGTase contém sete subsítios (KIM *et al.*, 1997; KLEIN *et al.*, 1992; Figura 2.8) e as variações na especificidade ao produto entre as várias CGTases pode ser atribuída às relações entre seus centros catalíticos semelhantes e subsítios diferentes (BENDER, 1990). Entretanto, o que determina a especificidade ao produto ainda não foi extensivamente estudado.

Kim *et al.* (1997) demonstraram que a mudança dos resíduos de aminoácidos localizados nas proximidades do sítio ativo pode modificar a especificidade ao produto da CGTase, porque diferentes resíduos alteram as características de ligação de cada subsítio. Uitdehaag *et al.* (2000) mostraram, por estudos de mutagênese, que o favorecimento de um modo de ligação em relação a outro nos subsítios da CGTase, altera a especificidade ao tamanho da ciclodextrina de uma maneira previsível.

Kelly *et al.* (2009) mostraram que a comparação sequencial de CGTases revelou que a incorporação e/ou substituição de aminoácidos específicos nos sítios ligantes ao substrato, durante a progressão evolutiva dessas enzimas, resultou na diversificação da especificidade ao produto da ciclodextrina. A sequência de alinhamento dos aminoácidos e análise do perfil de produto das CGTases revelaram que a substituição de resíduos e ganho e perda de resíduos de aminoácidos nos subsítios doadores -3/-7 são grandemente responsáveis pela diversidade da

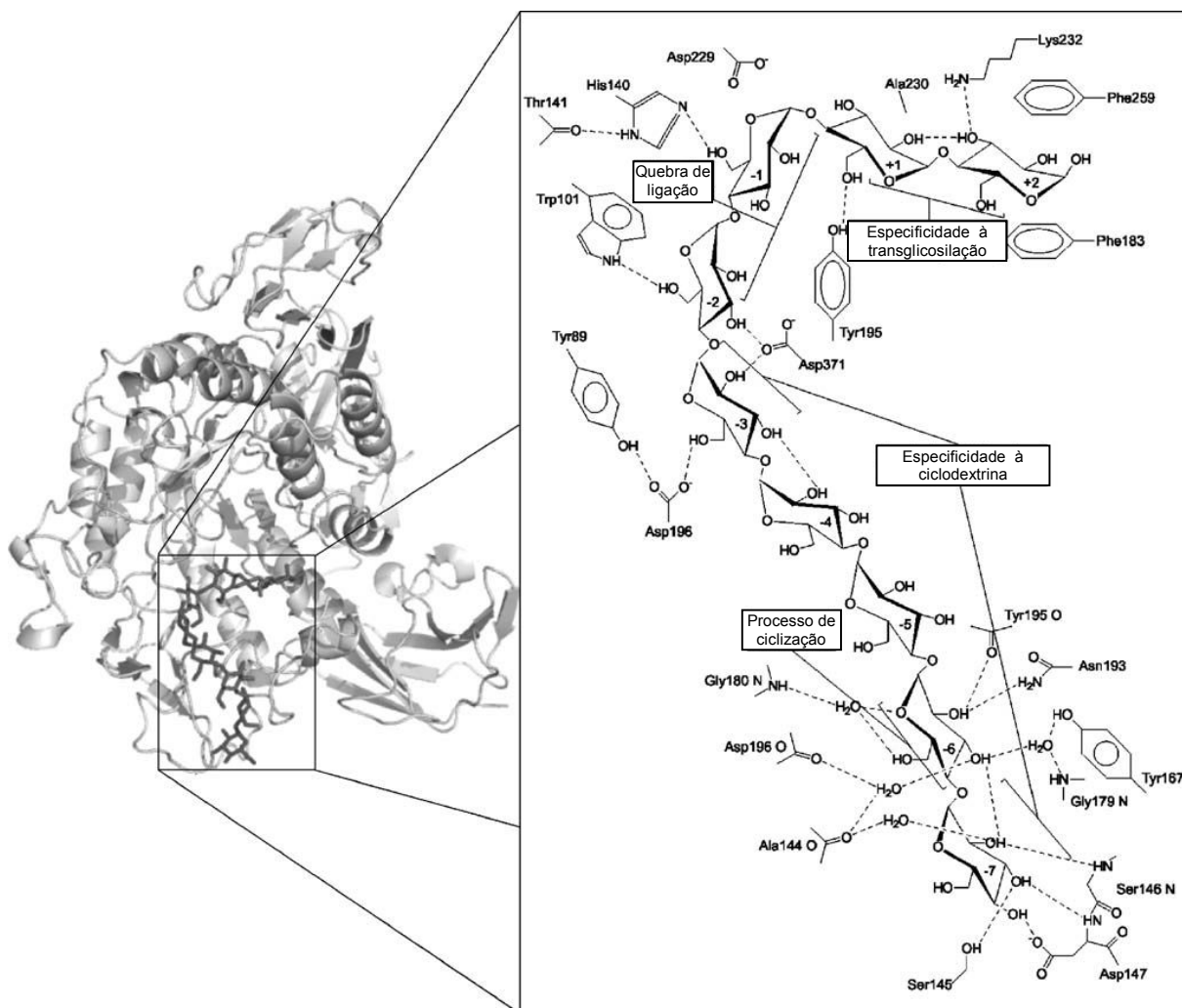


especificidade ao produto e que mudanças nos subsítios  $-1/+1/+2$ , ao contrário, são essenciais para o intercâmbio de especificidades com outros tipos de enzimas dessa família (Figura 2.9). Estes resultados fornecem uma visão valiosa para futuros esforços de engenharia genética para melhorar a especificidade ao produto das CGTases.



**Figura 2.8** – Estrutura esquemática do sítio ativo de CGTase de *Bacillus sp.* 1-5 baseada em um estudo cristalográfico por raios X de CGTase de *B. circulans* (KIM *et al.*, 1997; KLEIN *et al.*, 1992). Os subsítios para ligação de sete unidades glicosiladas são designados de S<sub>5</sub> a S<sub>2</sub>' da extremidade não-redutora à redutora. A ligação glicosídica é quebrada entre G<sub>7</sub> e G<sub>8</sub> ocupando os subsítios S<sub>1</sub> e S<sub>1</sub>'. São mostradas as posições relativas de Tyr-89, Asn-94 e Tyr-100.

A CGTase de *Thermoanaerobacter sp.* comercializada pela empresa NOVOZYMES é uma enzima produzida por uma linhagem de *Bacillus* (hospedeiro) geneticamente modificada que recebeu o gene para CGTase de uma linhagem de *Thermoanaerobacter* (doador). Esta enzima produz uma mistura aproximadamente igual de  $\alpha$ - e  $\beta$ -CD com pequena quantidade de  $\gamma$ -CD. A CGTase de *Thermoanaerobacter* é extremamente termoestável (estável em temperaturas acima de 100 °C, na presença de amido) e tem excelentes propriedades de liquefação do amido. O rendimento máximo de produção de CDs é obtido a uma temperatura de 85-90°C e pH 5,0-6,0 (NORMAN e JORGENSEN, 1992).



**Figura 2.9 – Representação estrutural de uma enzima CGTase, com um substrato de maltonaose ligado aos subsítios -7 a +2 (KELLY et al., 2009). O painel lateral mostra uma vista em detalhe da região do núcleo catalítico, com representação esquemática das interações entre os resíduos dos nove sítios da CGTase que se ligam ao substrato maltonaose. As principais contribuições de cada subsítio para a formação de ciclodextrinas são destacadas. Este painel foi adaptado de Uitdehaag et al. (1999).**

#### 2.1.2.4 Processos para a produção de ciclodextrinas

Em geral, dois tipos de processos de produção de CDs podem ser citados: “Processos com solventes”, onde um agente orgânico precipita seletivamente um tipo de CD e direciona a reação enzimática para produzir principalmente esse tipo, e “processos sem solventes”, em que nenhum agente complexante é adicionado resultando em uma mistura de diferentes CDs. Nesse tipo de processo a taxa de CDs produzidas depende apenas da CGTase empregada e das condições de reação. CDs produzidas sem a utilização de agentes orgânicos complexantes

podem ser aplicadas sem restrições na indústria farmacêutica e de alimentos, ao contrário das CDs produzidas em processos com solventes. No entanto, processos que empregam solventes apresentam maior rendimento e seletividade na produção de CDs (BIWER *et al.*, 2002).

O aumento de produção de CDs pelo uso de solventes orgânicos pode ser devido à formação de complexos de inclusão com as ciclodextrinas, evitando assim a inibição da CGTase pela formação do produto (LEE e KIM, 1992).

Muitos artigos científicos e patentes descrevem a produção de CDs pela CGTase. Como regra, à medida que a concentração de amido aumenta, o rendimento em CD cai drasticamente. Compostos tais como tolueno e tricloroetileno aumentam o rendimento, mas são tóxicos. Compostos menos tóxicos foram testados, tais como decanol e limoneno. Porém, o decanol é restrito para a produção da  $\alpha$ -CD e o alto custo do limoneno limita a produção em escala industrial utilizando esse aditivo. O etanol pode ser uma importante ferramenta na produção de CDs, por ser praticamente inofensivo e um aditivo que pode facilmente ser evaporado e reutilizado. Além disso, sua presença previne contaminações microbianas durante o processo. O etanol exclui moléculas de água do centro ativo da enzima, prevenindo reações hidrolíticas e retardando assim a decomposição da  $\beta$ -CD (MATTSSON *et al.*, 1991).

Processos sem solventes foram inicialmente desenvolvidos para a produção de  $\beta$ -CD. Em escala industrial, eles são particularmente usados no Japão. Devido à sua baixa solubilidade, a  $\beta$ -CD pode ser facilmente purificada por etapas de cristalização. A purificação de  $\alpha$  e  $\gamma$ -CD é possível por cromatografia, que é cara e complexa, com baixos rendimentos e gera uma série de sub-produtos. No entanto, processos mais econômicos têm sido publicados recentemente, os quais podem ter vantagens ambientais. A produção de  $\beta$ -CD começa com a liquefação e conversão do amido de forma idêntica à empregada nos processos com solventes, só que sem a presença de agente complexante. No final da reação, a CGTase é inativada, o pH é reduzido e glicoamilase é adicionada. A glicoamilase converte o amido não reagido e outras ciclodextrinas não cíclicas, que podem atrapalhar a purificação, em glicose e maltose. A solução é então clarificada usando-se carvão ativado, filtrada e concentrada sob vácuo a aproximadamente 60 % (m/v) de sólidos dissolvidos. Em alguns casos desionização é necessária antes do tratamento com carvão ativado. Após a cristalização e re-cristalização, a  $\beta$ -CD é isolada, lavada, centrifugada e seca. A solução remanescente, consistindo de glicose, maltose,  $\alpha$ -CD e  $\gamma$ -CD, é concentrada a um xarope que pode ser empregado como aditivo alimentar (BIWER *et al.*, 2002).

Horikoshi e Nakamura (1979) utilizaram CGTase com atividade em pH alcalino para produzir CDs a partir do amido de batata 4 % (m/v), em pH 9 a 10,5, gelatinizado. A reação foi conduzida a 50 °C por 30 horas. Após a reação, a mistura reacional foi aquecida a 100°C por 5 minutos para inativar a enzima, em seguida resfriada a 55 °C, e o pH foi ajustado a 5,0 com HCl. Para decompor o amido não reagido, glicoamilase foi adicionada e a reação mantida por 20 horas. Em seguida a solução foi clarificada por carvão ativado, filtrada e concentrada a pelo menos 40 % de CD. A  $\beta$ -CD foi obtida por precipitação, empregando uma pequena quantidade de cristais de  $\beta$ -CD como sementes para iniciar o processo de cristalização.

### 2.1.3 Separação e purificação de ciclodextrinas

Para isolar e purificar a  $\beta$ -CD, normalmente emprega-se a precipitação com redução da temperatura devido à sua baixa solubilidade em baixas temperaturas, ou mesmo a precipitação com solventes orgânicos. No entanto, processos para  $\alpha$ - e  $\gamma$ -CD são mais complicados. Em muitos processos em que o interesse é uma dessas duas CDs, retira-se primeiramente parte da  $\beta$ -CD por precipitação, para então aplicar-se a metodologia de purificação das demais CDs (BIWER *et al.*, 2002).

#### 2.1.3.1 Separação da $\beta$ -ciclodextrina por cristalização

A cristalização é uma operação importante na indústria química, como um método de purificação e para a obtenção de cristais dentro de um intervalo de tamanho desejado. Como é um processo de separação, pode-se usá-lo na recuperação de sais em meios aquosos, na produção de compostos orgânicos, na eliminação de impurezas e ainda na recuperação de substâncias indesejadas. Na operação de cristalização há transferência simultânea de calor e massa entre as soluções e as fases sólidas. O processo de cristalização consiste essencialmente de dois estágios: nucleação e crescimento dos núcleos. Pequenos cristais podem ser adicionados como germes (sementes), agindo como núcleos. O tamanho dos cristais formados é fortemente dependente da velocidade de resfriamento e a taxa de crescimento do cristal numa solução depende da temperatura e concentração do líquido na face do cristal (HERMES, 2008; MENDONÇA, 2008).

O carvão ativado pode ser usado para retirar impurezas acumuladas durante a produção das CDs. Normalmente, a quantidade de carvão ativado empregada para remover impurezas que conferem cor ao produto, pode ser menor que 5 % da massa de produto tratado (QI *et al.*, 1996). Esses autores estudaram a purificação de ciclodextrinas quimicamente modificadas tais como hidroxipropil- $\beta$ -CD utilizando carvão ativado proveniente de carvão mineral ou cascas de coco. Devido às impurezas orgânicas introduzidas durante o processo de modificação das CDs, foram necessárias maiores concentrações de carvão (50 a 300 % da massa de CDs modificadas). Dependendo do grau de impureza e do processo empregado (batelada com agitação suave ou operação contínua em coluna), foram necessárias de 2 a 8 horas, com temperaturas de 25 a 50 °C.

Kohl *et al.* (2004) investigaram taxas de crescimento de  $\beta$ -CD em solução aquosa, em experimentos conduzidos com monocristais (sementes) colocados em uma célula com escoamento e também em batelada. Medidas da distribuição de tamanho dos cristais das sementes e dos cristais finais formados foram feitas com técnica de difração a laser. No experimento em batelada a solução saturada de  $\beta$ -CD foi mantida a 50 °C por 30 minutos. As sementes de cristalização foram preparadas na proporção de 1,4 a 3,5 % (m/m) em relação aos cristais finais formados e mantidos em solução pouco abaixo do ponto de saturação a 48 °C por 3 horas, sendo então adicionadas à solução saturada. Essa solução, após a adição das sementes, era resfriada até 20 °C numa taxa de 10 °C por hora, sob agitação de 350 rpm. Os autores concluíram que a modelagem da nucleação, juntamente com a cinética do crescimento estimada, podem ser usadas para melhor monitorar o uso de sementes durante o processo de cristalização em batelada de modo a favorecer o crescimento dos cristais.

A  $\beta$ -CD obtida por cristalização, muitas vezes contém impurezas tais como amido retrogradado e partículas escuras. Diversos autores sugerem a recristalização como uma forma de purificação, tais como os citados a seguir:

French (1957) sugere que a  $\beta$ -CD obtida seja purificada dissolvendo-a em água (numa solução 2 %) e deixando-a em repouso por tempo considerável, de modo a promover a agregação de impurezas e complexos insolúveis. Após a filtração em filtro de vidro sinterizado de baixa porosidade, a solução pode ser concentrada a um décimo do volume original e deixada para cristalizar.

Armbruster (1970) recomenda que para retirar as impurezas presentes na  $\beta$ -CD, os cristais sejam dissolvidos em água quente, tratando essa solução a quente com carvão e

filtrando em seguida para retirar as impurezas impregnadas no carvão. Se estiverem presentes pequenas quantidades de  $\alpha$ -CD, a recristalização, assim como a lavagem do precipitado, podem ser empregadas para purificação da  $\beta$ -CD.

Sophianopoulos e Warner (1992) descrevem ainda, procedimentos empregados por outros autores na purificação da  $\beta$ -CD, tais como: filtrar individualmente em membranas as misturas reagentes antes de usá-las; recristalizar a  $\beta$ -CD a partir do etanol tratando-a com carvão vegetal; cristalizar a  $\beta$ -CD a partir da água fervendo e depois enxaguar com etanol ou acetona. Esses autores empregaram uma solução aquosa de 2-propanol a 35 % (v/v) e 60 % (v/v) para facilitar a decomposição de complexos e assim remover completamente as impurezas de uma  $\beta$ -CD comercial. Como a solubilidade da  $\beta$ -CD é bem maior nas misturas 2-propanol-água do que em água pura, a solução tratada é bem mais concentrada. Como esse solvente tem uma ligação muito fraca com a  $\beta$ -CD, ele pode ser removido facilmente ao final do processo pelo aquecimento a vácuo. A  $\beta$ -CD é então recristalizada.

#### 2.1.3.2 Precipitação de ciclodextrinas por solventes orgânicos

Armbruster (1970), buscando uma metodologia de purificação da  $\alpha$ -CD, produziu CDs a partir do amido gelatinizado de batata e uma CGTase proveniente do *Bacillus macerans*. Adicionou depois, ciclohexano como agente complexante para precipitar primeiramente a  $\beta$ -CD e depois de forma mais pura a  $\alpha$ -CD. O ciclohexano foi selecionado a partir de um grupo de solventes testados, sendo os demais: tetracloroetano, tricloroetileno, benzeno, hexano, 1-octanol, dissulfeto de carbono e tolueno.

Em 1972, Armbruster e Jacaway Jr. estudaram o efeito de diversos hidrocarbonetos e álcoois de cadeia longa utilizados como agentes complexantes para a produção de  $\alpha$ -CD, concluindo que os álcoois que contêm radical alifático saturado ou insaturado com cadeia longa, de pelo menos oito unidades de carbono, induzem predominantemente à formação de  $\alpha$ -CD. O uso do 1-decanol foi o que apresentou maiores rendimentos na produção dessa ciclodextrina.

Em trabalho publicado posteriormente, Armbruster (1988) apresentou uma comparação entre três solventes diferentes adicionados na concentração de 5 % (v/v) no meio reacional constituído de amido liquefeito de batata 30 % (m/m) e CGTase proveniente do

*Bacillus macerans*. Acompanhando as reações por sete dias observou que utilizando como solvente: **(i)** o tolueno, formou-se somente  $\beta$ -CD na concentração de 16 g/100 mL de substrato; **(ii)** o 1-decanol, houve grande formação de  $\alpha$ -CD. A  $\beta$ -CD formada inicialmente foi convertida a  $\alpha$ -CD a partir do segundo dia de reação e obteve 14 g de  $\alpha$ -CD/100 mL de substrato; **(iii)** o ciclohexano, houve formação de  $\alpha$  e  $\beta$ -CD nas primeiras 24 horas de reação. Decorrido esse tempo, a  $\alpha$ -CD passou a ser convertida. Ao final de sete dias de reação só havia  $\beta$ -CD, na concentração de 21 g/100 mL de substrato. Embora o tolueno e o 1-decanol representem boas alternativas para a obtenção, respectivamente, da  $\beta$ -CD e da  $\alpha$ -CD, o autor concluiu que o ciclohexano é a melhor opção, pois seu baixo ponto de ebulição (81 °C) permite sua completa remoção por aquecimento, além de apresentar baixos custo e toxidez. O tolueno possui maior toxidez, além de menor eficiência na conversão. Quanto ao 1-decanol, seu ponto de ebulição sendo 229 °C, há dificuldade em sua remoção por aquecimento. Além disso, a  $\alpha$ -CD complexa tão fortemente com o decanol que mesmo o uso de destilação a vapor não é eficiente para a separação do complexo.

Okada e Tsuyama (1974) utilizaram amido solúvel 10 a 18 % (m/v), CGTase de uma cultura com *Bacillus megaterium* (que converte o amido predominantemente em  $\beta$ -CD no início da reação) e tricloroetileno como agente complexante adicionado no começo da reação. A  $\beta$ -CD pura foi obtida numa proporção correspondente a 67 % do amido empregado. Em um controle empregando a enzima do *B. macerans* nas mesmas condições de reação, obtiveram apenas 41 % de rendimento e 85 % de pureza da  $\beta$ -CD.

Mattsson *et al.* (1991) observaram um aumento na conversão do amido em CDs quando a reação ocorreu na presença de etanol ou dimetilsulfóxido (DMSO). Um aumento de rendimento de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD com decréscimo na produção de  $\alpha$ -CD foi observado à medida que aumentaram a concentração de etanol de 0 a 15 % (v/v). Acima dessa concentração de etanol houve redução no rendimento de CDs e acima de 20 % um decréscimo abrupto foi verificado, possivelmente por desnaturação da enzima. Os autores observaram que o etanol atuou de forma similar para amidos de diferentes procedências (batata, milho, trigo, arroz, cevada, amilose e amilopectina da batata) testados na concentração de 10 % (m/v), com CGTase proveniente do *Bacillus circulans* var *alkalophilus* e etanol 5 % (v/v). Após 24 horas de reação a 60 °C, o grau de conversão aumentou de 32-38 % para 60-67 % na presença de etanol. Em testes realizados para o amido de batata, em que variaram as concentrações de amido e de etanol, os autores verificaram que o efeito do etanol foi mais pronunciado para

concentrações mais altas do amido (rendimento de CDs aumentou 2,4 vezes para o amido 30 % (m/v), na presença de 15 % (v/v) de etanol). Tanto o etanol quanto o DMSO causaram grande aumento na proporção de  $\beta$ -CD formada. Um aumento de 69 % para 84 % com etanol 15 % e para 92 % com DMSO 20 %.

Em 1995, Mori *et al.*, estudando as condições de reação para a produção de  $\gamma$ -CD a partir do amido solúvel e da CGTase proveniente do microrganismo *Brevibacterium sp.* No. 9605 observaram um aumento na produção desta CD na presença de etanol.

Um aumento na seletividade dos produtos obtidos pela ação da CGTase com a adição de solventes polares orgânicos, foi observado por Blackwood e Bucke (2000). Utilizando a CGTase do microrganismo *Thermoanaerobacter sp.*, os autores concluíram que todos os solventes testados, na concentração de 10 % (v/v), causaram um aumento na produção de CDs, sendo o melhor resultado (26 %) obtido com o etanol. A seletividade da CD formada variou com a natureza do solvente orgânico empregado: a  $\beta$ -CD foi favorecida na ausência de solventes e na presença de dimetilsulfóxido, t-butanol e dimetilformamida, enquanto a  $\alpha$ -CD o foi na presença de acetonitrila, etanol e tetrahidrofurano. Com a CGTase do microrganismo *Bacillus circulans* linhagem 251, aumentos relativamente pequenos na produção de CDs foram observados (5-10 %) com a adição dos solventes. No entanto, a adição de t-butanol causou a maior seletividade para a  $\beta$ -CD observada para essa enzima (aumento de 65 % para 82 %). Para todos os ensaios, o substrato foi o amido de batata parcialmente hidrolisado (Paselli SA2) na concentração de 5 % (m/v) e condições de reação: 24 horas a 50 °C e pH 6.

### 2.1.3.3 Cromatografia/adsorção na purificação de ciclodextrinas

Esse tipo de processo baseia-se em métodos de cromatografia para isolar e purificar um tipo de ciclodextrina a partir de misturas aquosas contendo sacarídeos acíclicos e ciclodextrinas. A separação é realizada com adsorventes macromoleculares específicos, que podem conter ligantes sinteticamente introduzidos. Esses ligantes devem ter tamanho ideal para penetrar na cavidade das moléculas de ciclodextrina e formar complexos de inclusão específicos com uma ou mais formas de ciclodextrinas (KORPELA *et al.*, 1990). A ciclodextrina pode ser então removida do complexo, com solventes específicos, muitas vezes a água.

Os suportes devem ser insolúveis em água, puros e passíveis de esterilização.



Exemplos de suportes incluem sílicas, celuloses, géis de poliacrilamida, esferas de estireno divinil benzeno, de poliacrilato, de poliestireno e outros materiais. Marcas comerciais desses suportes incluem DOWEX 1 e INDION A3. Os compostos de inclusão (ligantes) podem ser, por exemplo, qualquer estrutura aromática ou alifática contendo 5, 6, 7 ou 8 membros, tais como ciclohexano, ciclopentadieno, benzeno, norborano; estruturas com múltiplos anéis aromáticos como o naftaleno, antraceno, pireno; íons inorgânicos como cloreto, iodeto; ainda, compostos como o ácido benzóico, ácido p-nitro benzóico, ácido naftanóico e ácido fenil acético. Compostos alifáticos ou aromáticos que sejam bifuncionais e que formem ligações covalentes entre o suporte e o composto de inclusão são preferidos. Tais compostos ligantes podem ser, por exemplo, glicidoxipropiltrimetoxisilano ou butildietilaminoetil. Normalmente utiliza-se uma coluna para acondicionar o suporte contendo o ligante, de maneira a permitir que a solução com ciclodextrinas passe através do leito de partículas. Pode-se também empregar processos com leito fixo ou fluidizado (BEESLEY,1993).

Horikoshi *et al.* (1981a) isolaram  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD ou a mistura das três CDs, de uma solução contendo ciclodextrinas e açúcares redutores, contatando essa solução com: **(i)** uma resina de adsorção sintética hidrofóbica formada de um polímero poroso, para adsorver  $\beta$  e  $\gamma$ -CD, eluindo a  $\beta$ -CD e depois a  $\gamma$ -CD com água; **(ii)** uma resina de troca iônica fortemente ácida, para separar e coletar  $\alpha$ -CD; **(iii)** uma resina de troca iônica fortemente ácida para separar as três CDs da solução contendo os açúcares, seguida de partículas de resina gel para separar a  $\gamma$ -CD. Metodologia similar a essa foi descrita por Okada *et al.* (1983b), para separar ciclodextrinas dos açúcares redutores com posterior purificação da  $\gamma$ -CD.

Okada *et al.* (1983a) passaram soluções contendo ciclodextrinas e açúcares redutores através de colunas empacotadas com sais de metais alcalinos ou alcalinos terrosos de resina de troca catiônica fortemente ácida, concluindo que a  $\alpha$ -CD pode ser separada seletivamente por esse método. Segundo os autores, quanto menores as partículas de resina, melhor a separação das ciclodextrinas dos açúcares redutores. No entanto, partículas finas demais causam aumento da perda de carga ao passar a solução através da resina. Assim, as partículas devem estar na faixa de 20 a 200 mesh, de preferência entre 30 e 100 mesh. A temperatura de separação deve estar na faixa de 50 a 80 °C. Abaixo de 50 °C a separação não é eficiente e pode ocorrer contaminação por microrganismos. Por outro lado, acima de 80 °C ocorre decomposição dos açúcares e a vida útil da resina se torna baixa.

Mattsson *et al.* (1988) empregaram um processo de cromatografia de afinidade para a

purificação de  $\gamma$ -CD. O processo teve como princípio a formação de um complexo de inclusão com 1,8 anidrido ácido naftílico acoplado a Biogel P-6 previamente derivatizado com etileno diamina. Esse gel separou completamente a  $\gamma$ -CD das demais CDs e dextrinas acíclicas. O leito formado por 170 mL de gel acondicionado em uma coluna de 2,2x45 cm e a solução contendo açúcares e CDs foi eluída a 80 mL h<sup>-1</sup> em temperatura ambiente. A fração retirada de  $\gamma$ -CD teve seus cátions removidos, foi tratada com carvão, evaporada e seca. Recuperaram 80 a 85 % de  $\gamma$ -CD com 100 % de pureza.

Adsorventes específicos foram testados por Mäkellä *et al.* (1989) para a separação e purificação de ciclodextrinas. Enquanto a  $\alpha$ -CD foi adsorvida sobre suportes derivatizados com funções alquila, a  $\beta$ -CD foi adsorvida sobre suportes derivatizados com funções fenila ou fenil-substituídas, e a  $\gamma$ -CD sobre um gel derivatizado com um composto naftila. Dentre vários suportes testados, foram selecionados a celulose, Sepharose CL 4B e Bio-Gel P-6. Os autores observaram que não é economicamente viável a purificação da  $\beta$ -CD por esse método de afinidade. Por outro lado,  $\alpha$ - e  $\gamma$ -CD, por serem mais caras, podem ser obtidas de maneira vantajosa pelos métodos desenvolvidos no trabalho. Resultados similares foram descritos por Korpela *et al.* (1990).

Em 1991, Tsuchiyama *et al.* observaram que na escolha dos adsorventes para as ciclodextrinas, algumas considerações devem ser feitas: **(i)** O ligante deve ter uma forma que preencha a cavidade de cada CD; **(ii)** O adsorvente deve ser provido de um espaçador longo o suficiente para manter o ligante separado do suporte; **(iii)** Moléculas do ligante preso ao suporte devem ser estreitas para evitar interação entre elas; **(iv)** Um grupo de ligantes e espaçadores devem estar unidos ao suporte por ligações covalentes para que o adsorvente de CDs permaneça estável numa larga faixa de pH e temperatura; **(v)** Devido à dificuldade das CDs que são hidrofílicas acessarem suportes hidrofóbicos, recomendam o uso de polímeros hidrofílicos como suporte. Esses autores empregaram adsorventes compostos por suporte, espaçador e ligantes, quimicamente sintetizados, tais como resinas de troca iônica fortemente alcalinas e quitosana. Testaram diversos ligantes e espaçadores e concluíram que o ácido esteárico foi o ligante mais efetivo para a  $\alpha$ -CD, enquanto o ácido ciclohexanopropanamida-n-capróico foi o melhor para a  $\beta$ -CD.

Beesley (1993) separou e purificou  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD de maneira sequenciada com compostos de inclusão (benzoato de sódio, iodeto de sódio, fenil acetato de sódio, 1-naftil sulfonato de sódio e 2-naftil sulfonato de sódio), ligados à sílica gel (suporte) previamente

tratada com 3-bromopropiltriclorosilano e 3-(3-dietil) aminopropilamina (agente espaçador). De acordo com a afinidade do composto de inclusão com as CDs, as mesmas foram eluídas com tempos de retenção diferentes. O benzoato de sódio e o fenil acetato mostraram maior afinidade pela  $\beta$ -CD, o iodeto de sódio pela  $\alpha$ -CD, enquanto o 1-naftil sulfonato pela  $\gamma$ -CD. Utilizando-se o 2-naftil sulfonato, a  $\beta$ -CD e a  $\gamma$ -CD trocaram de posição na sequência de saída.

#### 2.1.3.4 Separação de ciclodextrinas por membranas e técnicas de filtração

O conceito básico do reator enzimático com filtração está na separação da enzima e produtos com uma membrana semipermeável. Reatores de ultrafiltração oferecem a possibilidade de converter o amido em CDs e reutilizar a enzima, reduzindo a inibição pelos produtos, aumentando assim a viabilidade do processo. O uso da membrana causa uma separação seletiva das moléculas de acordo com suas dimensões físicas. A separação do produto é obtida, com reciclo simultâneo do substrato não reagido e da enzima. Um suplemento de enzima pode ser necessário quando ocorre redução da atividade (KINALEKAR *et al.*, 2000). Esses autores utilizaram um sistema contínuo de produção de ciclodextrinas contendo uma unidade de ultrafiltração com membrana de polissulfona de 20 kDa. Para a produção de CDs, empregaram amido liquefeito e CGTase doada pela empresa Amano Pharmaceutical (Japão), a 60 °C e pH 6. Após a ultrafiltração, utilizaram enzima glicoamilase para a conversão das dextrinas lineares que haviam passado através da membrana de ultrafiltração. A retirada das CDs por ultrafiltração, com retorno da enzima e do substrato para o meio reacional, permitiu maior pureza do produto obtido, além de proporcionar maior rendimento no processo. O rendimento em CDs foi de 14,56 % para a  $\alpha$ -CD, 30,41 % para a  $\beta$ -CD e 9,72 % para a  $\gamma$ -CD.

Slominska *et al.* (2002) compararam a produção de ciclodextrinas em processo batelada com um processo contínuo utilizando um reator enzimático Amicon modelo 2000 RA com membrana de acetato de celulose (3 e 10 kDa). Empregaram como substrato o amido solúvel de batata (5 a 25 % (m/v)) e a enzima Toruzyme® (CGTase de *Thermoanaerobacter*), na temperatura de 90 °C e pH 5,0. Os autores concluíram que o reator de ultrafiltração proporcionou um aumento de 15 a 50 % na quantidade total de CDs produzidas quando comparado ao reator batelada, sendo a maior diferença observada para o processo com amido 20 %. A membrana selecionada para os experimentos foi a de 10 kDa

pois a de 3 kDa apresentou grande redução do fluxo de permeado. Para um tempo de residência de 5 horas, a concentração de substrato mais efetiva foi de 15 %.

Sakinah *et al.* (2008) utilizaram um reator com membrana de fibra oca, para produzir ciclodextrinas a partir de tapioca gelatinizada (tratada a 100 °C antes da reação) ou não gelatinizada, estudando assim o efeito da preparação do substrato na produção de CDs e na passagem pela membrana. A reação foi conduzida por 4 horas a 70 °C, pH 5,0, amido 4 % (m/v) e enzima Toruzyme® 0,5 % (m/v), em um reator de 10 L. A membrana de 32 kDa foi produzida pelos autores, em polietersulfona. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida e a concentração de CDs obtida foi de 29,7 mg mL<sup>-1</sup> para o amido gelatinizado e 19,9 mg mL<sup>-1</sup> para o não gelatinizado. Embora a produção tenha sido maior para o amido gelatinizado, devido ao maior intumescimento dos grânulos, houve um entupimento severo da membrana para esse substrato. A resistência observada foi 59 % maior do que para o amido não gelatinizado, uma vez que as moléculas expandidas rapidamente encobriram a superfície da membrana gerando um gel compacto.

Zhekova *et al.* (2009), investigaram dois métodos para aumentar o rendimento na produção de β-CD, com a CGTase proveniente de *Bacillus megaterium*, amido de milho e, para o processo de ultrafiltração, também o amido solúvel de batata: (a) Primeiramente, empregaram um processo com produção e ultrafiltração simultâneas utilizando membrana de acetato de celulose (3 kDa – Millipore), permitindo uma reutilização da enzima. Esse processo não apresentou rendimento maior que o convencional devido à inibição pela β-CD produzida, presente no meio de reação. (b) No segundo método investigado, um processo convencional em batelada, na presença de agentes complexantes tricloroetileno e tolueno na concentração de 5 % (v/v). Em relação ao mesmo processo sem os agentes complexantes, a produção de β-CD dobrou e a seletividade da CGTase pela β-CD foi melhorada. O aumento de produção deveu-se à remoção da β-CD produzida, precipitada pelos agentes complexantes, evitando a inibição pelo produto. Usando o processo descrito, os autores obtiveram produtos contendo 75-79 % de β-CD e 4-6% de α- e γ-CD. Nos processos empregados as reações foram conduzidas a 45 °C, pH 7, concentração de substrato de 50 mg mL<sup>-1</sup>, e teor de CGTase de 2 U g<sup>-1</sup>, com tempo de reação de 8 horas.

Na Tabela 2.5 é apresentado um resumo para os processos de produção e purificação de CDs que foram discutidos nos itens 2.1.2.4 a 2.1.3.4.

**Tabela 2.5 – Processos de produção e purificação de CDs.**

Autores	Processo	Método	Observações
Horikoshi e Nakamura (1979)	Produção de $\beta$ -CD sem uso de solventes.	Produção com separação por cristalização e precipitação da $\beta$ -CD.	Baixo rendimento, sem toxidez.
Armbruster (1988), Okada e Tsuyama (1974), Mattsson et al. (1991), Mori et al. (1995), Blackwood e Bucke(2000)	Produção e separação de CDs com uso de solventes.	No meio reacional ou após reação: etanol, dimetilsulfóxido, tolueno, tricloroetileno, decanol, acetonitila, t-butanol, ciclohexano, dimetilformamida, tricloroetileno, benzeno, hexano, etc.	Maior rendimento, seletividade das CDs, com toxidez.
Horikoshi et al. (1981), Okada et al. (1983), Mattsson et al. (1988), Korpela et al. (1990), Tsuchiyama et al. (1991), Beesley (1993)	Separação e purificação de CDs por cromatografia (adsorção).	Utiliza-se <u>adsorventes macromoleculares</u> , que podem conter ligantes com tamanho ideal para penetrar na cavidade das CDs e formar complexos de inclusão. Depois se remove as CDs por solventes específicos ou água.	Para a $\beta$ -CD não é economicamente viável.
KINALEKAR et al. (2000), Slominska et al. (2002), Sakinah et al. (2008), Zhekova <i>et al.</i> (2009)	Separação de CDs por membranas e técnicas de filtração.	Separação da enzima e produtos com uma membrana semipermeável. Reutiliza-se a enzima e reduz-se a inibição pelos produtos.	Entupimento da membrana para soluções muito concentradas ou amido gelatinizado.
French (1957), Armbruster (1970), Sophianopoulos e Warner (1992)	Recristalização da $\beta$ -CD.	Dissolve-se o precipitado contendo a $\beta$ -CD impura, filtra-se, centrifuga-se e cristaliza-se novamente. Pode-se utilizar carvão ativado.	Eliminam-se amido retrogradado, partículas escuras, resíduos amiláceos.

#### 2.1.4 Aplicação das ciclodextrinas em fármacos

As CDs constituem uma nova classe de excipientes farmacêuticos com capacidade para formar complexos de inclusão reversíveis com moléculas apolares. A habilidade das CDs de incluir fármacos induz melhoras na biodisponibilidade, solubilidade, estabilidade e segurança de muitas fórmulas farmacêuticas atualmente comercializadas. Também se pode destacar sua utilização para mascarar odores e sabores desagradáveis de certos fármacos, para reduzir ou eliminar irritações oculares ou gastrointestinais e na prevenção de interações e incompatibilidades. Vários estudos comprovam a capacidade protetora das CDs contra reações de oxidação, hidrólise e fotólise de fármacos tanto em solução como também em estado sólido. O efeito estabilizante está diretamente relacionado com a inclusão na cavidade da CD dos grupos químicos do fármaco suscetíveis de reagir (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007). As CDs aumentam a permeabilidade das substâncias hidrofóbicas insolúveis, tornando o princípio ativo disponível na superfície da barreira biológica, por exemplo, pele, mucosa ou córnea, sem afetar as camadas lipídicas da barreira (CHALLA *et al.*, 2005).

A incorporação das CDs em sistemas farmacêuticos constitui uma realidade consolidada. Associações com CDs já foram estudadas com mais de 500 princípios ativos, melhorando sua biodisponibilidade, estabilidade e segurança pela formação de complexos de inclusão reversíveis em água (SZEJTLI, 2005). A Tabela 2.4 relaciona a maioria das apresentações comerciais disponíveis, suas aplicações e procedências.

Quando em uma solução aquosa de ciclodextrina se adiciona um composto menos polar que a água, tendo ambos forma e dimensões compatíveis, as moléculas de água que preenchem a cavidade da ciclodextrina, estando em um estado energeticamente menos favorável, são substituídas pela nova molécula. A cavidade central da ciclodextrina vai atuar então como uma molécula hospedeira, podendo alojar uma ou mais moléculas hóspede(s) total ou parcialmente, caso haja compatibilidade para formar o complexo de inclusão. As ciclodextrinas formam complexos de inclusão com substâncias que possuem tamanho, polaridade e forma geométrica compatíveis com a dimensão de sua cavidade. Alternativas para a formação de complexos com moléculas significativamente maiores que sua cavidade, poderão ser obtidas por meio de uma interação parcial da molécula hóspede ou mediante a formação de complexos ciclodextrina-hóspede de estequiometria diferente de 1:1 (BUDAL,

2003), como é representado na Figura 2.10.

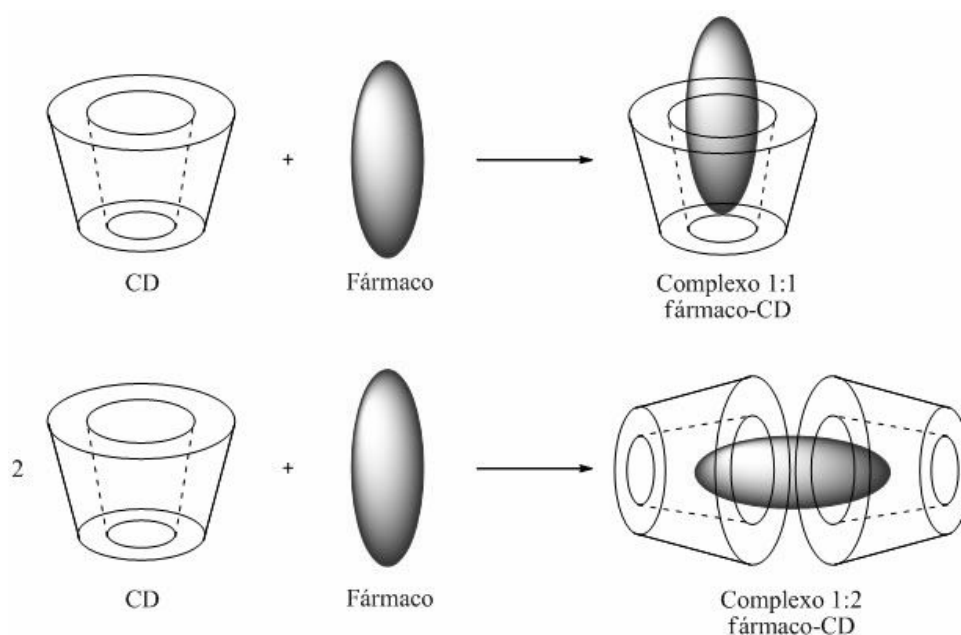
**Tabela 2.4 – Medicamentos atualmente disponíveis no mercado mundial contendo CDs (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007).**

	Fármaco	Nome comercial	Indicação	Formulação	Fabricante/País
BCD	Benexate	Ulgut, Ionmiel	Antiulcerogênico	Cápsulas	Teikoku/Japão
	Dexametasona	Glymesason	Analgésico	Creme dérmico	Fujinaga/Japão
	Iodine	Mena-Gargle	Antisséptico	Líquido tópico	Kyushin/ Japão
	Nicotina	Nicorette Nicogum	Redução dos sintomas de abstinência	Comprimido sublingual/ Goma de mascar	Pharmacia Upjohn/Suécia
	Nimesulida	Mesulid/Nimedex	Antiinflamatório	Sachê oral	Novartis/Itália
	Nitroglicena	Nitropen	Dilatador coronário	Comprimido sublingual	Nippon Kayaku/ Japão
	Omeprazol	Omebeta	Antiulcerogênico	Comprimido	Betapharm/Alemanha
	PGE <sub>2</sub>	Prostarmon E	Indução de parto	Comprimido sublingual	Ono/Japão
	Piroxicam	Cicladol Brexin	Antiinflamatório	Comprimido/Sache/ Supositório	Masterpharma/Itália, Chiesi/Italia
	Ácido tiaprofênico	Surgamyl	Analgésico	Comprimido	Roussel-Maestrelli/Itália
	Óleo de alho	Xund/Tegra/Allide/ Garlessence	Arteriosclerose	Drágea	Bipharm/Alemanha
	Cefalosporina	Meiact	Antibiótico	Comprimido	Meiji Seika/Japão
	Difenildramina	Stada-Travel	Antiemético	Comprimido mastigável	Stada/Alemanha
	Clordiazepóxido	Transillium	Ansiolítico	Comprimido	Gador/Argentina
	Cisaprida	Coordinax Prepulsid	Estimulante TGI	Supositório	Jassen/Bélgica
	Cetirizina	Cetirizin	Antialérgico	Comprimido mastigável	Losan Pharma/Alemanha
	Dextrometorfanol	Rynathisol	Antitussivo	Solução oral	Synthelabo/França
RM/BCD	17β-estradiol hemihidratado	Aerodiol	Terapia hormonal	Spray nasal	Servier/França
RM/BCD	Cloranfenicol	Clorocil	Antibiótico	Colírio	Oftalder/Portugal
SBCD	Ziprasidona	Zeldox/Geodon	Antipsicótico	Solução parenteral	Pfizer/EUA
SBCD	Voriconazol	VFEND	Antimicótico	Solução parenteral	Pfizer/EUA
HP/BCD	Indometacina	Indocid	Antiinflamatório	Colírio	Merk Sharp & Dohme/UE
HP/BCD	Itraconazol	Sporanox Liquid	Antifúngico	Oral	Janssen/Bélgica
HP/BCD	Mitomicina	Mitozytrex/ MitoExtra	Antineoplásico	Solução parenteral	Novartis/Suíça
aCD	PGE <sub>1</sub>	Prastandim/ Edex/Viridal	Vasodilatador	Solução parenteral	Ono/Japão Schwarz Pharma/Alemanha
	Cefotiam-hexatil	Pansporin T	Antibiótico	Comprimido	Takeda/Japão
	3-metoxi Limaprost	Opalmon/ Prorenal	Vasodilatador	Comprimido	Ono/Japão, Dainippon Pharma/Japão
HP <sub>2</sub> /CD	Diclofenaco sódico	Voltaren Ophtha	Antiinflamatório e Analgésico	Colírio	Novartis/ Suíça
	Tc-99 Teboroxime	Cardiotec	Diagnóstico	Solução parenteral	Bracco/EUA

As forças envolvidas no processo de formação dos complexos são, ainda, objeto de discussão na comunidade científica. Sabe-se que não se trata apenas de interação apolar clássica. Estão envolvidas forças de Van de Waals, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e alguns autores apontam, também, a liberação de energia devido à substituição

de moléculas de água por outras menos polares e devido a alterações conformacionais, que contribuem para a formação e estabilização do complexo (SALTÃO e VEIGA, 2001).

A associação e dissociação das moléculas do fármaco e das CDs são processos dinâmicos que ocorrem muito rapidamente num espaço de tempo da ordem de milissegundos, mesmo para complexos com constantes de estabilidade ( $K$ ) mais elevadas. Sendo assim, a cinética de liberação do fármaco a partir das CDs não é um fator limitante na absorção. O complexo fármaco-CD é formado fora do organismo e depois da administração dissocia-se, eliminando-se rápida e uniformemente (OLIVEIRA *et al.*, 2009).



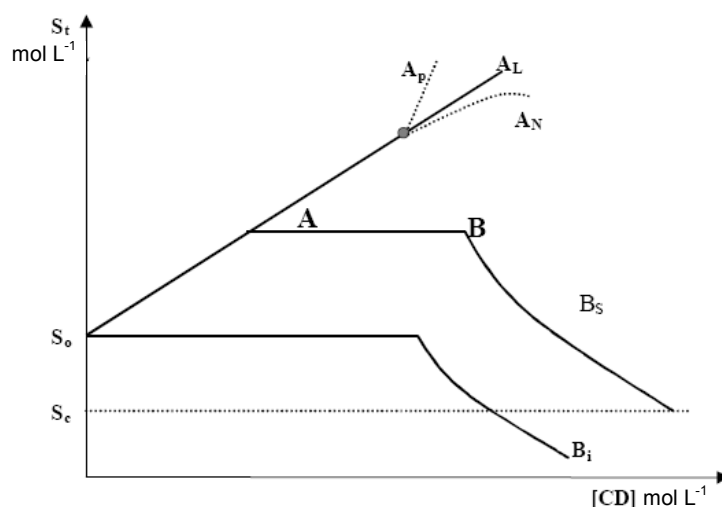
**Figura 2.10 – Complexos fármaco-ciclodextrinas (adaptado de SILVA, 2008).**

#### 2.1.4.1 Caracterização de complexos em solução - Diagramas de solubilidade de fases

As propriedades físico-químicas do fármaco e da CD livre são relativamente diferentes das que estes compostos possuem quando estão complexados. A teoria desenvolvida por Higuchi e Connors (1965), constitui a aproximação mais empregada na caracterização de complexos de inclusão em solução. Fundamenta-se na medida do efeito da complexação na solubilidade do substrato e permite inferir a estequiometria de inclusão e estimar uma constante relacionada com o grau de estabilidade do complexo formado. Segundo esta teoria (Figura 2.11), perfis do tipo  $A$  são obtidos quando a solubilidade do substrato aumenta com o incremento da concentração de CD. Quando o complexo é de primeira ordem com respeito à CD e de primeira ordem ou superior com respeito ao substrato, um perfil tipo  $A_L$  é obtido. Se



o complexo formado é de primeira ordem em relação ao fármaco, mas de segunda ordem ou superior em relação à CD, o perfil de solubilidade obtido possui um desvio positivo da linearidade, sendo classificado como diagrama do tipo  $A_P$ . Perfis do tipo  $A_N$  possuem interpretação mais complexa devido à multiplicidade de fenômenos que podem ocorrer. Perfis do tipo  $B$  são obtidos com a formação de complexos de baixa solubilidade aquosa, em alguns casos, inclusive, inferior à da molécula hospedeira e que precipitam à medida que há inclusão (CHALLA *et al.*, 2005; BREWSTER e LOFTSSON, 2007).



**Figura 2.11 – Diagramas de solubilidade de substâncias complexadas em CD (adaptado de Higuchi e Connors, 1965).**

A inclusão molecular é uma reação de equilíbrio caracterizada por uma constante de ligação ou de equilíbrio ( $K$ ). A biodisponibilidade dos fármacos pode depender de vários fatores. Quando a solubilidade ou a taxa de dissolução são os fatores que limitam a biodisponibilidade da substância, a formação de um complexo solúvel por inclusão em CD pode melhorar a sua biodisponibilidade. Para maximizar o efeito, a constante de ligação não deve ter valor muito elevado e somente a quantidade de CD que leve a um efeito de dissolução máxima do princípio ativo deve ser utilizada (ROQUETTE-PHARMA, 2010).

Estudos mostram que CDs formam complexos de inclusão e não-inclusão e que vários tipos diferentes de complexos podem coexistir em soluções aquosas. Além disso, é sabido que as CDs e os complexos com CDs formam agregados e cogita-se que estes agregados são capazes de solubilizar fármacos hidrofóbicos e outras moléculas, por meio de mecanismo do tipo micelar. Além disso, excipientes farmacêuticos comuns tais como polímeros e sais de tampão, podem participar da formação do complexo. Assim, as constantes de estabilidade obtidas a partir de diagramas de solubilidade de fase são constantes aparentes de estabilidade

que descrevem o efeito combinado de várias estruturas complexas sobre a solubilidade da droga (LOFTSSON *et al.*, 2007).

#### 2.1.4.2 Obtenção e caracterização dos complexos de inclusão

Os complexos podem ser obtidos e caracterizados utilizando-se diferentes técnicas. Neste trabalho foram utilizadas as técnicas descritas a seguir.

##### 2.1.4.2.1 Obtenção dos complexos – Método *kneading*

Este método é aplicável a ingredientes ativos fracamente solúveis em água. A CD é macerada intensamente com uma pequena quantidade de água, formando uma pasta, e o “hóspede” é adicionado diretamente, sem o uso de qualquer solvente, seguindo-se um amassamento da mistura. O tempo de amassamento depende do “hóspede”. O complexo resultante pode ser seco diretamente ou lavado com água ou solvente orgânico para remover o “hóspede” livre misturado ao complexo de inclusão. As pastas algumas vezes secam formando uma massa firme ao invés de um pó fino. Isto depende do “hóspede” e da quantidade de água (ou solvente) usada na pasta. Geralmente, a massa firme pode ser seca completamente e triturada para obter uma forma em pó da mistura contendo o complexo (SZEJTLI, 1988; BERGAMASCO, 2003).

##### 2.1.4.2.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

É um tipo de análise térmica na qual a amostra e a referência ficam submetidas a um calorímetro diferencial, que realiza uma medida exata do calor de transição entre esses materiais, independente do calor específico, condutividade térmica e outras variáveis da amostra ([http://pt.wikipedia.org/wiki/Varredura\\_diferencial\\_de\\_calorimetria](http://pt.wikipedia.org/wiki/Varredura_diferencial_de_calorimetria), 2011).

Esta técnica pode ser usada para demonstrar a complexação de alguns “hóspedes” (BERGAMASCO, 2003):

1. “hóspedes” com alto ponto de ebulição: a DSC revela dois picos para a CD livre. A 100 °C há um pico para a liberação de água e a 300 °C um pico aparece devido à decomposição da CD. Muitos complexos não têm pico, ou um pico reduzido a 100 °C que resulta do deslocamento das moléculas de água da cavidade pelo “hóspede”.

2. “hóspedes” voláteis: a formação do complexo com “hóspedes” voláteis resulta em um aumento na temperatura de ebulição do “hóspede”. Assim, a temperatura de ebulição aumentada é uma indicação de complexação.
3. “hóspedes” com ponto de fusão baixo: similarmente, a ausência de um pico de fusão para alguns “hóspedes” é uma indicação de complexação. Esta técnica é limitada para aqueles “hóspedes” que têm ponto de fusão ou ebulição menor que a temperatura de decomposição da CD (300 °C).

#### 2.1.4.2.3 Termogravimetria (TGA)

Estas técnicas fornecem dados quantitativos de perda de massa com o aumento da temperatura. A CD perde seu teor de água quando a temperatura de aquecimento se aproxima de 100 °C, e começa a se decompor acima de 250 °C. Este método é adequado para determinar se um produto particular é um complexo verdadeiro. Se a substância hóspede não está complexada, então, frequentemente sofre alguma alteração antes da degradação térmica da CD (250-300 °C). Esta alteração pode ser devido à evaporação, decomposição, oxidação, fusão ou transição polimórfica (SZEJTLI, 1988).

#### 2.1.4.3 Aspectos biofarmacêuticos

As ciclodextrinas podem ser administradas a seres humanos ou animais, fazendo parte de medicamentos ou alimentos, seja na forma livre ou como complexos de inclusão. Se a ciclodextrina é administrada por via oral, fazendo parte do complexo, ocorre sua dissociação no trato gastrointestinal, sendo processos separados, a absorção da molécula hóspede e da ciclodextrina. Estas por sua vez, são degradadas a açúcares absorvíveis no cólon intestinal pela microflora, e finalmente excretadas como dióxido de carbono e água (BUDAL, 2003).

A toxicidade das CDs está diretamente vinculada à absorção sistêmica e consequentemente é dependente da via de administração. Na administração oral de CDs, estudos comprovam sua inocuidade em doses elevadas. Para a  $\beta$ -CD, a administração de preparados por via endovenosa provoca precipitação microcristalina desta CD nos rins devido à sua limitada solubilidade, além da formação de complexos com o colesterol, provocando sérios danos renais. É por isso que muitos derivados solúveis das CDs foram desenvolvidos, como por exemplo, metil, hidroxipopil e hidroxietil CDs. A Hidroxipopil- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD) é

aproximadamente 30 vezes mais solúvel e mais benigna toxicologicamente do que a  $\beta$ -CD. As corporações farmacêuticas detentoras das patentes e produtoras de CDs e seus derivados investem muitos recursos na elaboração de dossiês técnicos de segurança, com especial enfoque na administração parenteral das CDs modificadas, que já aparecem incorporadas em alguns preparados injetáveis comerciais. Assim, as restrições toxicológicas à utilização das CDs têm sido superadas. A pureza e o preço parecem não ser entraves para sua introdução no mercado farmacêutico, ao menos para as CDs naturais e seus derivados mais utilizados, principalmente em medicamentos de elevado valor agregado. Apesar disso, os elevados custos de pesquisas pré-clínicas e clínicas, sem a correspondente proteção de patentes, inibe sua incorporação na melhoria farmacocinética das formulações que já estão no mercado (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007; BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

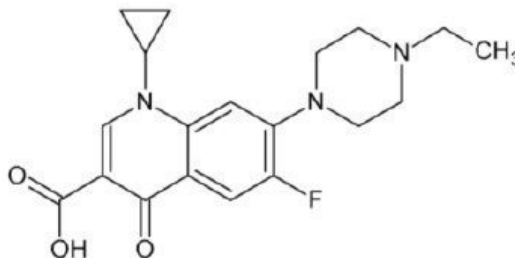
## 2.2 ENROFLOXACINA

As fluorquinolonas são um grupo de substâncias sintéticas empregadas no combate a infecções. Entre os princípios ativos pertencentes a esse grupo, a enrofloxacin (FLOX) se destaca na medicina veterinária. É um antibiótico de uso exclusivo para animais, de amplo espectro de ação contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e micoplasmas. Atua sobre a enzima (DNA-girase) responsável por vários processos vitais às bactérias (todos os processos que envolvam a replicação, transcrição e manutenção do DNA bacteriano), bloqueando-a e conseqüentemente levando à inviabilidade das bactérias. A FLOX apresenta-se na forma de cristais amarelo-pálidos, é pouco solúvel em água e solúvel em soluções acidificadas com ácidos minerais diluídos. Seu sabor desagradável dificulta a administração via oral em animais (LIZONDO *et al.*, 1997; VALGAS, 2005).

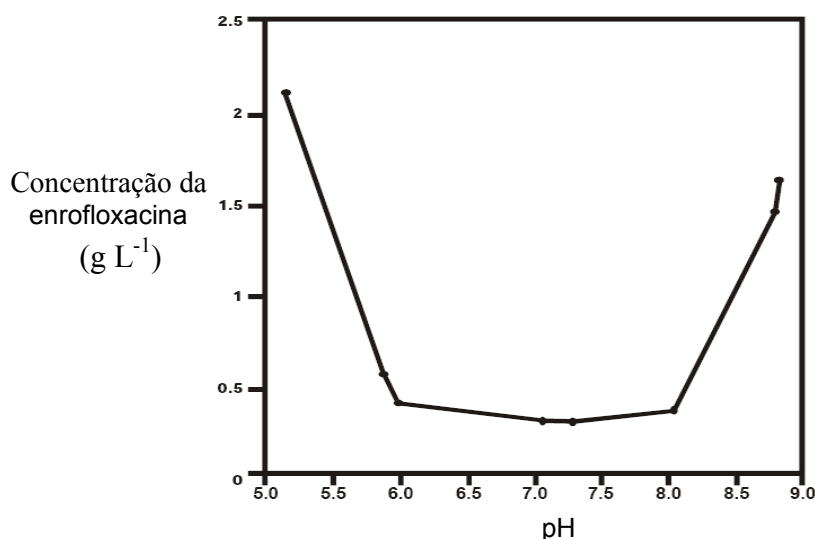
A FLOX possui massa molecular de 359,40, com fórmula molecular  $C_{19}H_{22}FN_3O_3$  (Figura 2.12), sendo sua denominação química: ácido 1-ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-ácido quinolínico carboxílico (BUDAVARI *et al.*, 1996).

A solubilidade da FLOX foi determinada por Lizondo *et al.* (1997) em amostras com variação do pH entre 5,05 e 8,83, estabilizadas por 48 horas a 25°C (Figura 2.13). O diagrama de solubilidade em função do pH da solução apresentou um mínimo de concentração nas vizinhanças do ponto isoelétrico e as maiores solubilidades foram observadas em pH ácido. As constantes de dissociação foram determinadas obtendo-se  $pka_1 = 5,94 \pm 0,09$  e  $pka_2 = 8,70$

$\pm 0,44$ . O ponto isoelétrico,  $(pka_1+pka_2)/2$ , foi 7,32. Os autores reportaram uma máxima solubilidade de  $10,42 \text{ g L}^{-1}$  em pH 5,02.



**Figura 2.12 – Fórmula estrutural da enrofloxacin (Mahendran *et al.*, 2010).**



**Figura 2.13 – Solubilidade da FLOX em função do pH da solução (LIZONDO *et al.*, 1997).**

Lipossomas contendo FLOX foram aplicados por Degim *et al.* em 2002, para estudar a infecção intracelular em cães e visualizar a fagocitose desses lipossomas. A FLOX foi escolhida como substância modelo. Os lipossomas preparados continham 1, 2 e 4  $\text{mg mL}^{-1}$  do princípio ativo. Mostraram-se mais efetivos do que com a FLOX em solução para as infecções intracelulares por *S. aureus* nas células sanguíneas de cães, e maiores concentrações do fármaco podem ser obtidas na célula quando a FLOX é utilizada na forma de lipossomas, uma vez que os lipossomas carregam a FLOX diretamente para o interior da célula fagocitária, mas a FLOX em solução tem de ser difundida através da membrana da célula.

Chun e Choi (2004) constataram a viabilidade de mascarar o gosto da FLOX pelo atraso da sua taxa de dissolução com a formação de complexos entre o fármaco e carbopol,

abalizados em dados reportados de que o uso de um sistema com resina de troca iônica foi efetivo para retardar a taxa de dissolução de uma substância mascarando seu sabor amargo. O carbopol é um polímero, que em seu estado natural se apresenta na forma de granulado semi-transparente; devido à sua solubilidade e à não reatividade ele é muito usado na indústria cosmética e farmacêutica.

Microesferas de malonil quitosana como uma matriz para a liberação de FLOX administrada via oral, foram estudadas por Valgas *et al* (2005). Estudos *in vivo* da liberação controlada da FLOX foram realizados em ratos e os resultados indicaram aumento e prolongamento dos níveis do medicamento no sangue e melhor biodisponibilidade para as microesferas contendo FLOX em relação aos comprimidos comerciais.

Baluja *et al* (2008), determinaram a solubilidade da FLOX em vários solventes variando a temperatura de 20 a 37 °C, concluindo que a solubilidade dela é maior na seguinte ordem dos solventes: 1,2 diclorometano > 1,2 dicloroetano > acetona > metanol e que a solubilidade foi mais afetada pela temperatura na presença do 1,2 dicloroetano.

Seedher e Agarwal (2009) estudaram o aumento da solubilidade da FLOX em água, utilizando uma série de co-solventes e surfatantes. O melhor resultado foi obtido quando empregaram 50 mmol L<sup>-1</sup> de dodecil sulfato de sódio em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato, pH 7,4 a 25 °C, aumentando em 26 vezes a solubilidade da FLOX (até 3,8 mg mL<sup>-1</sup> de FLOX foram dissolvidos). Os co-solventes sozinhos produziram apenas pequeno aumento na solubilidade. No entanto, a combinação de co-solventes e tampão foi sinérgica e um grande aumento na solubilidade pôde ser alcançado.

Enquanto uma série de produtos contendo CDs são amplamente conhecidos na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, para as próximas décadas novas aplicações são esperadas para o uso de CDs para proteção ambiental, biotecnologia, indústria têxtil, dentre outras (SZEJTLI, 2004).

Do exposto, observa-se que no Brasil não há processos industriais para a produção de CDs, assim como para a separação das CDs produzidas. Nesse contexto, a proposta do trabalho fundamentou-se no desenvolvimento da tecnologia de produção e separação de CDs, comparando-se amido de milho e mandioca comerciais, empregando-se processos em batelada única e bateladas sequenciadas, com pré-tratamento ou não dos grânulos de amido. A enzima CGTase Toruzyme® foi escolhida devido à sua capacidade de hidrolisar o amido, permitindo assim a utilização do amido sem pré-tratamento, e por ser termo-resistente, o que propiciou o

emprego de uma alta temperatura no meio reacional. Outra parte do trabalho foi o estudo da inclusão molecular da FLOX em CDs, tendo em vista o interesse demonstrado por uma empresa de fármacos e uma vez que na literatura não há registros a esse respeito.

A partir desse ponto a apresentação do trabalho será dividida em duas partes, sendo a parte 1 referente aos estudos de produção e separação das CDs e a parte 2 relacionada aos estudos com a inclusão molecular da FLOX.

## **PARTE 1**

# **PRODUÇÃO E SEPARAÇÃO DE CICLODEXTRINAS**



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais e métodos empregados nos ensaios referentes à produção e separação das ciclodextrinas. Todos os experimentos foram conduzidos com o amido de milho como substrato, tanto para aqueles em que se estudou a influência da concentração de etanol no meio reacional, como para aqueles onde se comparou o processo com duas bateladas sequenciadas em relação à batelada única. O amido de mandioca também foi avaliado de modo a comparar o rendimento de ciclodextrinas obtido com esses dois substratos.

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Substratos

Como substratos foram empregados o amido de milho comercial Maizena® e a fécula de mandioca fornecida pela empresa Pasquini & Cia Ltda. (Nova Esperança – PR).

##### 3.1.2 Enzimas

Na produção das ciclodextrinas (CDs), a enzima empregada foi a formulação líquida comercial (Toruzyme®), contendo ciclomaltodextrina-glicano-transferase (CGTase, EC 2.4.1.19) produzida por uma linhagem de *Bacillus* (hospedeiro) geneticamente modificada, a qual recebeu o gene para CGTase de uma linhagem de *Thermoanaerobacter* (doador), enquanto para a conversão dos malto-oligossacarídeos em glicose, a enzima utilizada foi a amiloglicosidase AMG 200L. Ambas foram doadas pela empresa Novozymes A/S, Dinamarca.

##### 3.1.3 Reagentes analíticos

Beta-ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e albumina de soro bovino foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (EUA); alfa-ciclodextrina ( $\alpha$ -CD) da Fluka Chemie AG (Suécia) e gama-

ciclodextrina ( $\gamma$ -CD) cedida pela Wacker Consortium (Alemanha).

Azul Brilhante de Coomassie foi adquirido da Sigma Chemical Company (EUA), o reagente enzimático GOD-POD da *In Vitro* Diagnóstica e fenolftaleína da Vetec (Brasil). Todos os demais reagentes empregados foram de grau analítico.

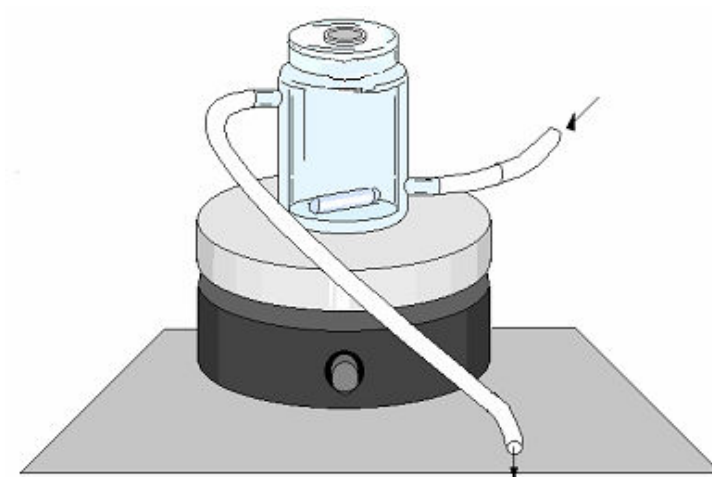
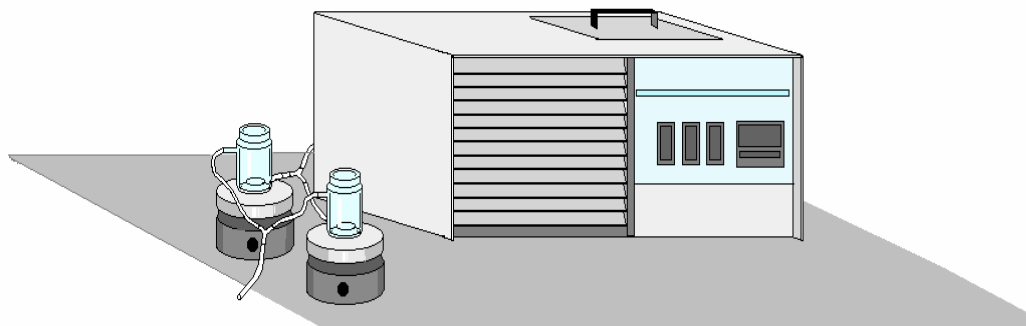
### 3.1.4 Reator

Para os testes de conversão de amido em CDs foram utilizados reatores tipo batelada, de vidro, com camisa para circulação de água na temperatura de ensaio, com 100 mL de volume útil. A agitação do meio reacional foi realizada por um agitador magnético e a temperatura da água de circulação foi mantida por um banho termostático. Um esquema do reator é mostrado na Figura 3.1. Para os ensaios realizados com volumes maiores, empregou-se um frasco erlenmeyer tampado, em banho termostático, com agitação magnética.

### 3.1.5 Equipamentos

- Espectrofotômetros UV-1203 e UV-1601-PC – Shimadzu
- Medidor de pH DMPH-1 – Digimed
- Agitador de tubos (Vórtex) AP 56 – Phoenix
- Banho termostático TE-184 – Tecnal
- Agitador magnético 257 – Fanen
- Agitador magnético com aquecimento IKA RH basic KT/C
- Agitador orbital termostático – Tecnal TE-422
- Ultra-centrífuga Jouan GR 20.22
- Cromatógrafo líquido Gilson, com detector IR Iota 2
- Cromatógrafo líquido Varian 920-LC
- Cromatógrafo gasoso Varian 3300
- Evaporador rotativo Fisatom 802
- Balança analítica BEL

- Titulador Karl Fischer AF8 - Analyser



**Figura 3.1 – Reatores tipo batelada.**

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Determinação do teor de proteína da enzima

O teor de proteína da enzima Toruzyme® foi determinado pelo método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando-se o reagente Azul Brilhante de Coomassie e a albumina bovina (padrão de proteína) indicados no item 3.1.3. A coloração da solução é convertida de castanho escuro a azul, após sua ligação com a proteína, num processo rápido (aproximadamente 2 minutos). O complexo formado (proteína-corante) permanece disperso em solução por longo tempo (aproximadamente 1 hora) e a variação do máximo de

absorvância pode ser detectada a 595 nm.

Procedimento:

- O reagente de Bradford foi preparado dissolvendo-se 0,1 g de Azul Brilhante de Coomassie em 50 mL de etanol 95 %, em seguida acrescentando-se 100 mL de ácido orto-fosfórico 85 % e completando-se com água destilada, para um volume final de 1 L.
- As amostras de enzima foram diluídas com água destilada para se adequarem à faixa de operação do método (concentração de proteína de 0 a 1,0 g L<sup>-1</sup>).
- Em tubos de ensaio, foram colocados 0,1 mL da amostra e adicionou-se 5 mL do reagente de Bradford. Após agitação em agitador tipo vórtice, aguardou-se 5 minutos e leu-se a absorvância a 595 nm, utilizando-se cubetas de plástico de 1 cm de caminho óptico. O teste foi conduzido à temperatura ambiente. A calibração do zero no aparelho foi feita mediante um teste em branco, preparado pela adição de 5 mL de reagente de Bradford a 0,1 mL de água destilada.
- A concentração de proteína foi calculada a partir de uma curva de calibração obtida pela determinação das absorvâncias de uma série de 10 concentrações padrões de albumina na faixa de 0,1 a 1,0 g L<sup>-1</sup>. Para estas concentrações as absorvâncias lidas no aparelho estavam na faixa de 0,060 a 0,580.
- Amostras de CGTase (Toruzyme®) foram diluídas numa proporção de 1:10 em água e as absorvâncias foram medidas em 595 nm. A concentração de proteínas foi calculada utilizando-se a equação da reta ajustada pela curva de calibração.

### 3.2.2 Determinação de glicose

Para a determinação da glicose produzida durante a reação de hidrólise dos malto-oligossacarídeos com a enzima amiloglicosidase (AMG), foi empregado o método enzimático GOD-POD (TRINDER, 1969).

A glicose é oxidada a ácido glucônico pela enzima glicose-oxidase, com produção de peróxido de hidrogênio. Este sofre a ação da enzima peroxidase que em presença de 4-amino-antipirina e um reagente fenólico, produz um cromôgeno vermelho-violeta (antipirilquinonimina) cuja absorção em 505 nm é diretamente proporcional à concentração de

glicose na amostra, na faixa de leitura (*IN VITRO* DIAGNÓSTICA, 2010).

Procedimento:

- As amostras obtidas nos ensaios foram diluídas com água destilada, quando necessário, para se adequarem à faixa de concentração da curva padrão de glicose (0,1 a 1,0 g L<sup>-1</sup>).
- Em tubos de ensaio colocou-se 0,1 mL da amostra, à qual adicionou-se 2 mL do reagente GOD-POD e levou-se a um banho termostático a 37 °C por 15 minutos. Os tubos foram resfriados em um banho com água à temperatura ambiente, diluiu-se as amostras com 3 mL de água destilada, agitou-se em vórtice e efetuou-se a leitura no espectrofotômetro a 505 nm.
- A calibração do zero no aparelho foi feita utilizando-se um teste em branco, preparado pela adição de 2 mL de GOD-POD a 0,1 mL de água destilada, passando pelo mesmo procedimento das demais amostras.
- A concentração de glicose foi calculada a partir da curva de calibração obtida pela determinação das absorvâncias de uma série de 10 concentrações padrões de glicose na faixa de 0,1 a 1,0 g L<sup>-1</sup>.

### 3.2.3 Determinação da $\beta$ -ciclodextrina pelo método colorimétrico da fenolftaleína

O espectro de absorção de algumas moléculas orgânicas, em particular alguns corantes, sofre uma alteração após a complexação com as CDs. Esta alteração pode ser usada para a determinação da concentração de CDs, utilizando-se curvas de calibração, construídas a partir de amostras de concentrações conhecidas.

Na determinação da concentração de  $\beta$ -CD foi empregado o método colorimétrico da fenolftaleína (MCFE), desenvolvido por Vikmon (1981) e modificado por Hamon e Moraes (1990). Este método fundamenta-se no fato de que a fenolftaleína, de máxima coloração rosa em pH 10,5 e medida a 550 nm, apresenta um decréscimo na intensidade de sua cor, devido à sua complexação com as CDs, que é muito mais marcante para o complexo  $\beta$ -CD/fenolftaleína, sendo este complexo o de maior estabilidade. Para baixas concentrações de  $\beta$ -CD, o descoloramento da solução de fenolftaleína pode ser tomado como proporcional à concentração de  $\beta$ -CD presente no meio. Acima do limite de linearidade, utiliza-se a teoria da

complexação, que permite a obtenção da relação não-linear entre a absorvância e a concentração de  $\beta$ -CD (TARDIOLI *et al.*, 2006), de fato válida para toda a faixa de concentração e que conduz à maior precisão nas determinações, uma vez que os dados apresentam, mesmo para baixas concentrações de  $\beta$ -CD, uma ligeira concavidade.

Procedimento:

- As dosagens foram realizadas misturando-se 0,5 mL de cada amostra contendo  $\beta$ -CD, com 2,5 mL de uma solução de fenolftaleína 0,06 mmol L<sup>-1</sup>, contendo tampão carbonato-bicarbonato pH 10,5 (0,12 mol L<sup>-1</sup>), e lendo-se a absorvância em 550 nm. Para o branco, a amostra foi substituída por água destilada.
- Preparou-se a solução de fenolftaleína 0,06 mmol L<sup>-1</sup> no momento da dosagem misturando-se 2 mL de solução estoque de fenolftaleína 3 mmol L<sup>-1</sup> (0,0955 g de fenolftaleína em 100 mL de etanol 95 %), 20 mL de tampão carbonato-bicarbonato pH 10,5 (0,6 mol L<sup>-1</sup>) (5,0880 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 1,0880 g de NaHCO<sub>3</sub> em 100 mL de água destilada), e completou-se o volume para 100 mL com água destilada.
- A concentração de  $\beta$ -CD foi determinada pela Equação 3.1 (TARDIOLI *et al.*, 2006), sendo ABS a absorvância da amostra a 550 nm, ABS<sub>0</sub> a absorvância do branco a 550 nm, C <sub>$\beta$ -CD</sub> a concentração de  $\beta$ -CD expressa em mmol L<sup>-1</sup>, e *k* a constante de equilíbrio da formação do complexo  $\beta$ -CD/fenolftaleína. O valor da constante de equilíbrio do complexo foi determinado preparando-se uma curva padrão de absorvância em função da concentração de  $\beta$ -CD, na faixa de 0 a 1 mmol L<sup>-1</sup>.

$$C_{\beta\text{-CD}} = 0,3 \left[ 1 - \frac{\text{ABS}}{\text{ABS}_0} \right] \left[ 1 + \frac{\text{ABS}_0}{5 \cdot 10^{-5} (k) \text{ABS}} \right] \quad (3.1)$$

### 3.2.4 Determinação das ciclodextrinas por cromatografia líquida de alta eficiência

Para determinar a concentração de CDs das amostras dos experimentos mais relevantes, análises foram efetuadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), à temperatura ambiente. A coluna utilizada foi a Microsorb-MV100 NH<sub>2</sub>-5 $\mu$ m, 250x4,6 mm, marca Varian, e a fase móvel foi acetonitrila 65 % e água 35 %, à temperatura ambiente. Inicialmente utilizou-se a vazão de 0,7 mL min<sup>-1</sup>, mas como foi necessária a substituição desta coluna por outra, apesar de possuir a mesma especificação e marca, a vazão foi alterada para

2 mL min<sup>-1</sup> pois os picos demoravam mais para serem detectados. Utilizou-se detector IR com atenuação 1. Foram preparadas curvas padrão com quatro diferentes concentrações das CDs, variando de 0,2 a 1 g L<sup>-1</sup> para a  $\alpha$ -CD e a  $\beta$ -CD e de 0,1 a 0,5 g L<sup>-1</sup> para a  $\gamma$ -CD. Todas as amostras analisadas foram previamente filtradas em filtro Millipore 0,45  $\mu$ m. A partir das áreas obtidas nos cromatogramas das amostras analisadas, aplicadas nas curvas padrões, foram obtidas as concentrações das CDs produzidas, em g L<sup>-1</sup>.

Para as análises, empregou-se o cromatógrafo Gilson quando o substrato foi o amido de milho e o cromatógrafo Varian para o amido de mandioca.

### 3.2.5 Preparação da suspensão de amido

Para os testes de conversão de amido em CDs, preparou-se uma suspensão na concentração de 150,0 g L<sup>-1</sup>, levando-se em conta a umidade do amido (9,25 % (m/m) para o amido de milho e 11,05 % (m/m) para a fécula de mandioca (determinada com o equipamento titulador Karl Fischer). Antes de completar o volume da suspensão, acrescentou-se 10 % (v/v) de tampão citrato de sódio pH 6 (10 mmol L<sup>-1</sup>) e etanol na concentração desejada no experimento (0, 5, 10 e 15 % (v/v)).

### 3.2.6 Determinação das condições de trabalho

Todos os experimentos desta seção foram conduzidos por 24 horas, em reatores batelada de 100 mL, com agitação magnética. Os reatores foram mantidos hermeticamente fechados para evitar a evaporação do etanol. Colocou-se o substrato no reator, acrescentou-se a enzima e em seguida, ligou-se a circulação do banho termostático a 65 °C, acionando-se o cronômetro.

#### 3.2.6.1 Procedimento de inativação, centrifugação e análise das amostras coletadas

- As amostras coletadas, de 1 mL, foram acrescentadas a 1 mL de solução de ácido clorídrico 0,02 mol L<sup>-1</sup> e levadas ao banho fervente por 5 minutos para inativar a enzima.

- Em seguida, foram centrifugadas a 30 °C e 5000 x g por 10 minutos e seu sobrenadante diluído e dosado pelo MCFE (item 3.2.3), tendo como padrão de dosagem a  $\beta$ -CD (Sigma). As absorvâncias foram lidas a 550 nm.
- Para os experimentos mais relevantes, análises foram efetuadas também por CLAE (item 3.2.4), com o objetivo de quantificar a produção de ciclodextrinas.

### 3.2.6.2 Temperatura, pH e concentração de substrato

Norman e Jorgensen (1992), observaram que o pH ótimo da CGTase empregada no trabalho ocorre na faixa de 5,0 a 6,7 e a temperatura ótima entre 90 e 95 °C. Neste trabalho optou-se pelo pH 6, de acordo com resultados de Domingues *et al.* (2007), Kim *et al.* (1995) e Tardioli *et al.* (2006). Utilizou-se 65 °C pois essa é a máxima temperatura que se pode empregar sem que ocorra ruptura dos grânulos de amido de milho (KIM *et al.*, 1995). Para que os resultados pudessem ser comparados, utilizou-se essa mesma temperatura para os ensaios com o amido de mandioca. A concentração de amido foi fixada em 15 % (m/v), de acordo com Domingues *et al.* (2007).

### 3.2.6.3 Concentrações de Toruzyme® e etanol a serem utilizadas na produção de CDs

Inicialmente testou-se a concentração de enzima Toruzyme® a ser utilizada (0,05; 0,1 e 0,2 % (v/v)), no substrato contendo 15 % (v/v) de etanol, para se obter uma conversão adequada num tempo pré-estipulado. As amostras foram analisadas pelo MCFE. Para a concentração de 0,1 % (v/v) de enzima, alguns pontos foram também analisados por CLAE. Foi feita a comparação entre os dois métodos na dosagem da  $\beta$ -CD.

Com o volume de enzima definido, variou-se a proporção de etanol no substrato: 0; 5; 10 e 15 % (v/v). Devido às várias amostragens nesses experimentos, houve perda de etanol do meio reacional da ordem de 50 % após 24 horas de reação (as amostras de 2 mL foram diluídas com 2 mL de água destilada, refrigeradas a 10 °C e centrifugadas por 10 minutos a 5000 x g. O sobrenadante foi filtrado e analisado por cromatografia gasosa, a 90°C, com coluna empacotada Carbowax e detector de condutividade térmica). Assim, o ensaio variando-se a concentração de etanol foi repetido, conduzindo-o pelo tempo de 24 horas, coletando-se as amostras apenas com intervalos de 12 horas, para que não houvesse perda de



etanol, pois isso atrapalharia a comparação do rendimento para as diferentes concentrações de etanol testadas. Este ensaio foi também realizado com amido de mandioca. Um segundo objetivo deste teste, foi determinar se sem a perda do etanol, haveria uma vantagem significativa de aumento da produção de CDs ao dobrar-se o tempo de reação de 12 para 24 horas. Esta análise é importante, pois para o processo industrial, caso não se observasse um aumento significativo da produção com o tempo de reação de 24 horas, então a escolha de 12 horas conduziria a uma maior produtividade do reator batelada.

Para o volume de etanol selecionado, repetiu-se o ensaio em que se variou a concentração de enzima, com amostragens em 12 e 24 horas, para o amido de milho.

#### 3.2.6.4 Fração do amido pré-tratado que sofre a ação da Toruzyme®

Realizou-se um teste com o intuito de verificar a possível solubilização de parte do amido no sobrenadante do processo de pré-tratamento dos grânulos e a atuação da enzima Toruzyme® nos grânulos pré-tratados do amido e na fração de amido do sobrenadante após a centrifugação desses grânulos. Procedeu-se da seguinte forma:

- No reator batelada foram colocados 100 mL de substrato contendo 15 % (m/v) de amido de milho e 10 % (v/v) de tampão citrato de sódio pH 6 ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e manteve-se sob agitação a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 hora.
- Centrifugou-se por 30 minutos, a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $12000 \times g$ .
- Separou-se o sobrenadante e o precipitado, acrescentou-se em cada um deles 15 mL de etanol e completou-se o volume para 100 mL com água contendo 10 % (v/v) de tampão citrato de sódio pH 6 ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ).
- As duas soluções foram colocadas nos reatores termostatizados a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ , sob agitação magnética, com 0,1 mL da enzima. Acompanhou-se a reação por 24 horas, com amostragens nos tempos 0, 1, 2, 3, 5, 8, 12 e 24 horas.
- Procedeu-se com as amostras conforme descrito e analisou-se a produção de  $\beta$ -CD pelo MCFE.

### 3.2.7 Determinação da atividade da CGTase pelo método das velocidades iniciais

Para determinar a atividade da enzima CGTase pelo método das velocidades iniciais, nas condições de reação do item 3.2.6, utilizou-se o seguinte procedimento:

- Preparou-se 100 mL de suspensão de amido de milho na concentração de 15 % (m/v), contendo 10 mL de etanol e 10 mL de tampão citrato de sódio pH 6 (10 mmol L<sup>-1</sup>).
- Acrescentou-se 0,1 mL da enzima CGTase, seguindo o procedimento descrito no item 3.2.6 para a reação e amostragem.
- A reação foi acompanhada por 90 minutos, com amostras coletadas nos tempos: 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 90 minutos. Essas amostras foram analisadas por MCFE e CLAE.
- Com os dados obtidos, foram obtidas curvas de concentração de ciclodextrina em função do tempo de reação, tomando-se o coeficiente angular do intervalo linear e calculando-se a atividade enzimática da CGTase usando-se a Equação 3.2, onde  $A_E$  é a atividade específica (U mg<sup>-1</sup>) da enzima,  $\Delta C / \Delta t$  é o coeficiente angular da região linear na curva (mmol min<sup>-1</sup>),  $V_R$  é o volume reacional (mL),  $V_E$  é o volume de enzima utilizada (mL) e  $C_P$  é a concentração de proteínas da preparação líquida comercial de CGTase (mg mL<sup>-1</sup>). Uma unidade (U) catalisa a produção de 1  $\mu$ mol de ciclodextrina por minuto, nas condições descritas.

$$A_E = \frac{(\Delta C / \Delta t) \times V_R}{V_E \times C_P} \quad (3.2)$$

### 3.2.8 Produção de CDs por batelada única e separação da $\beta$ -CD produzida, por cristalização e precipitação

Para a produção de ciclodextrinas e separação da  $\beta$ -CD por cristalização e precipitação, adotou-se a metodologia representada no fluxograma apresentado na Figura 3.2 e descrita a seguir:

- Preparou-se 250 mL de suspensão de amido de milho a 15 % (m/v), pH 6, contendo 10 % (v/v) de etanol. Acrescentou-se 0,1 % (v/v) de CGTase e manteve-se reagindo por 12 horas a 65 °C .
- Centrifugou-se essa suspensão a 12.000 x g, por 20 minutos, a 30 °C.

- A solução sobrenadante, contendo CDs, teve o seu pH reduzido a 3 utilizando-se uma solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> e foi aquecida a 80 °C por 10 minutos para inativação da CGTase. Após resfriamento até a temperatura ambiente, o pH foi ajustado em 4,5 utilizando-se NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>.
- Em seguida, adicionou-se 0,1 % (v/v) de amiloglicosidase, mantendo a solução sob agitação a 50 °C (ZANIN, 1989), pelo tempo de 3 horas, para transformar os oligossacarídeos presentes em glicose, com o objetivo de facilitar a posterior precipitação da β-CD (BIWER *et al.*, 2002; HORIKOSHI e NAKAMURA, 1979). O tempo de 3 horas foi determinado por experimentos preliminares, onde se acompanhou a formação de glicose dosando-a pelo método colorimétrico GOD-POD. Observou-se que nessas condições de reação, após 3 horas, não houve aumento na concentração de glicose no meio reacional.
- A solução foi resfriada até 40 °C, adicionando-se em seguida carvão ativado (1 % do volume inicial de reação (m/v)), mantendo-se nessa temperatura em agitador orbital a 150 rpm, por 2 horas (QI *et al.*, 1996). O carvão foi empregado para retirar os resíduos enzimáticos e eventuais impurezas presentes no substrato ou adquiridas ao longo do processo.
- As partículas maiores do carvão foram retiradas passando-se a solução por uma tela de aço inoxidável e em seguida a solução foi centrifugada a 30 °C, 12.000 x g, por 10 minutos e filtrada a vácuo com papel de filtro de passagem lenta.
- Para concentrar a solução a aproximadamente 1/3 do seu volume inicial, visando a precipitação da β-CD, ela foi aquecida à temperatura de 80 °C, utilizando-se evaporador rotativo a vácuo.
- De acordo com a metodologia citada por Kohl *et al.* (2004), o resfriamento gradual foi feito sob agitação magnética. Ao atingir 50 °C, 0,05 g de cristais de β-CD (2,5 % (m/m) em relação aos cristais a serem formados), foram adicionados à solução (semente). A solução de trabalho foi então resfriada a uma taxa de aproximadamente 10 °C h<sup>-1</sup>, até 20 °C, mantendo-a nessa temperatura, sob agitação, por 12 horas, obtendo-se uma suspensão devido à redução do volume e da temperatura.
- A suspensão foi então transferida para tubos de centrifuga e resfriada até 10 °C, sendo mantida nesta temperatura por 15 horas, sem agitação.
- Centrifugou-se essa suspensão e o precipitado foi seco por 12 horas em estufa a 50 °C,

sendo em seguida triturado em almofariz de porcelana, passado por peneira 35 mesh (425  $\mu\text{m}$ ) e colocado em estufa a 80 °C por 12 horas.

- Para a determinação da pureza da  $\beta$ -CD obtida, preparou-se uma solução 1 g L<sup>-1</sup> do precipitado e analisou-se por CLAE.

Visando determinar se todas as etapas do processo eram realmente necessárias, experimentos foram realizados eliminando algumas delas e comparando os resultados obtidos com o processo completo.

Experimento 1: procedimento completo, com todas as etapas descritas no fluxograma

Experimento 2: sem semente

Experimento 3: sem AMG e semente

Experimento 4: sem AMG, carvão ativo e semente

Para os cálculos do rendimento das CDs produzidas em relação ao amido utilizado, empregaram-se as Equações 3.3 e 3.4, onde RaCDs é o rendimento de CDs ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) produzidas (%), Ra $\beta$  é o rendimento de  $\beta$ -CD produzida (%),  $CDs$  = massa de CDs ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) presente no precipitado (g),  $\beta CD$  = massa de  $\beta$ -CD presente no precipitado (g),  $Ma$  = massa de amido utilizada (g).

$$RaCDs = \frac{CDs}{Ma} \times 100\% \quad (3.3)$$

$$Ra\beta = \frac{\beta CD}{Ma} \times 100\% \quad (3.4)$$

Os resultados estão apresentados na Tabela 4.3, e de acordo com os resultados discutidos na seção 4.4, chegou-se ao fluxograma simplificado (Figura 3.3) para a produção de CDs por batelada única e separação da  $\beta$ -CD por cristalização e precipitação.

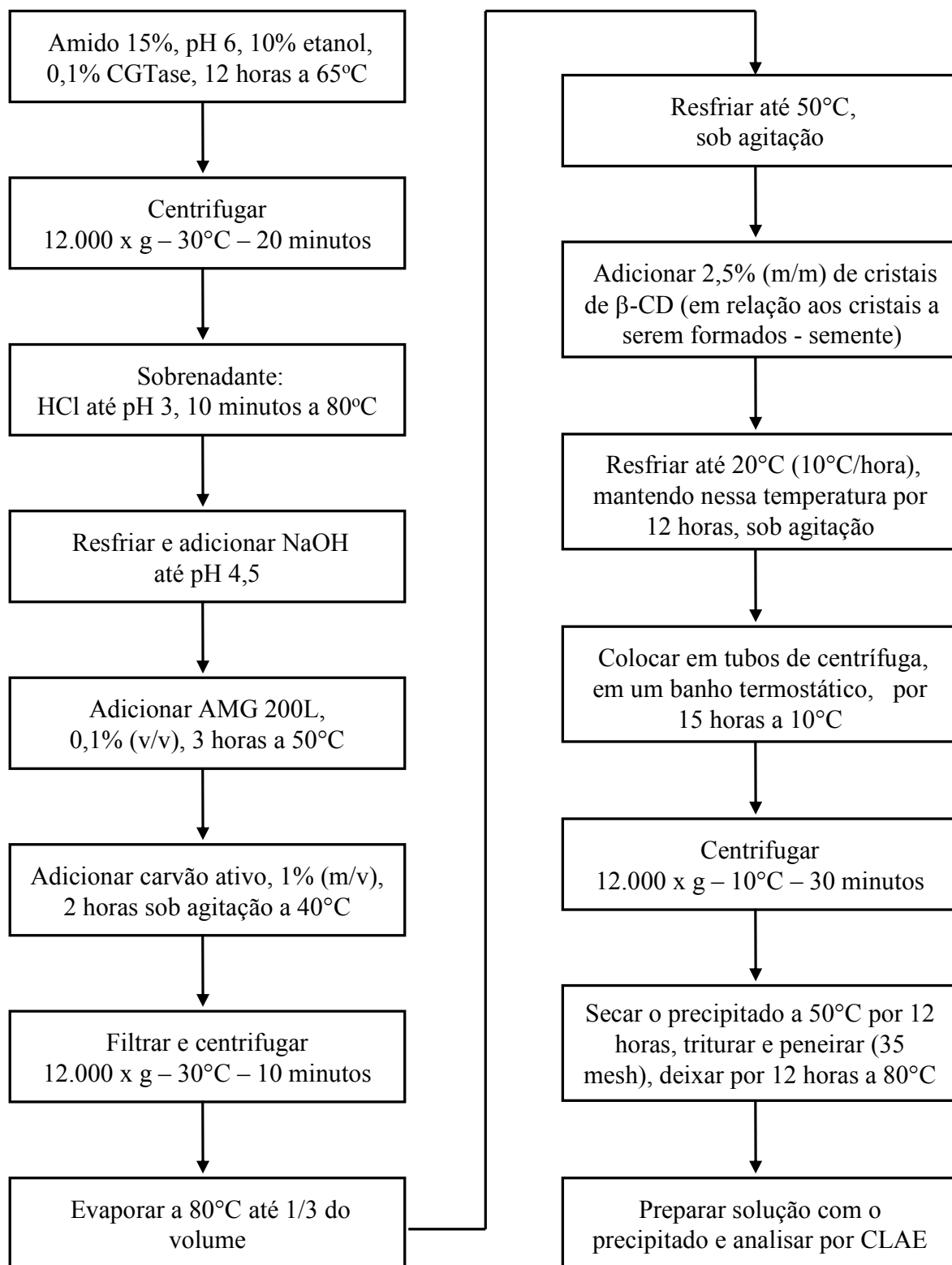


Figura 3.2 – Fluxograma dos procedimentos utilizados na produção de CDs por batelada única e separação da β-CD por cristalização.

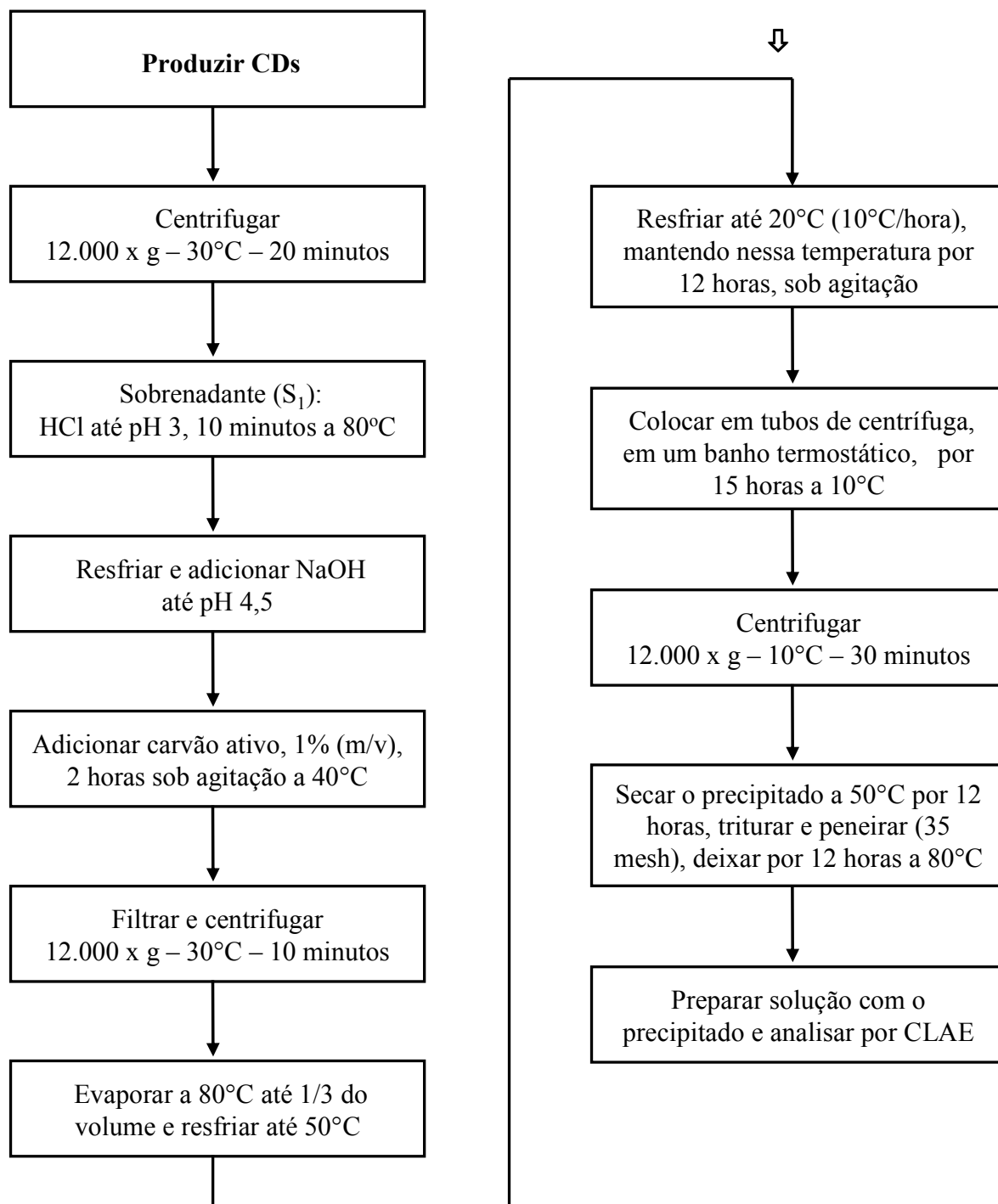


Figura 3.3 – Fluxograma simplificado dos procedimentos utilizados na produção de CDs por batelada única e separação da  $\beta$ -CD por cristalização.

### 3.2.9 Produção de CDs em bateladas sequenciadas

Os experimentos foram conduzidos em reator batelada, de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.6, tanto para o amido de milho quanto para o de mandioca. Os procedimentos estão apresentados no fluxograma da Figura 3.4 e descritos a seguir:

- Com o objetivo de recuperar parte da CGTase utilizada na reação de produção de CDs, a produção em duas bateladas sequenciadas foi estudada nas condições anteriormente definidas: amido 15 % (m/v), etanol 10 % (v/v), CGTase 0,1 % (v/v), pH 6, 65 °C. A primeira batelada foi conduzida por 12 horas, seguida de centrifugação (30 °C, 20 minutos, 12000 x g). Após a retirada de uma alíquota de sobrenadante resultante da primeira batelada ( $S_1$ ) para análise de CDs, esse sobrenadante contendo a CGTase, as CDs e malto-oligossacarídeos, foi submetido a dois procedimentos diferentes, para verificar em qual deles a enzima seria adsorvida de maneira mais eficiente:
  - (i) Foram adicionados 15 % (m/v) de amido cru ao sobrenadante  $S_1$ , completando-se o volume para 100 mL com água destilada contendo 10 % (v/v) de etanol e 10 % (v/v) de tampão citrato de sódio pH 6 (10 mmol L<sup>-1</sup>).
  - (ii) Uma suspensão de amido 15 % (m/v), contendo 10 % (v/v) de etanol e 10 % (v/v) de tampão citrato de sódio pH 6 (10 mmol L<sup>-1</sup>), foi deixada sob agitação magnética por 1 hora, a 65 °C para o amido de milho e 55 °C para o de mandioca (porque a 65 °C a suspensão com o amido de mandioca ficava muito viscosa), e centrifugada em seguida (30 °C, 30 minutos, 12.000 x g). Descartou-se o sobrenadante resultante ( $S_{pt}$ ) e ao precipitado ( $P_{pt}$ ) contendo os novos grânulos de amido pré-tratados, foi adicionado o sobrenadante  $S_1$ , ajustando-se o volume para 100 mL com água destilada contendo 10 % (v/v) de etanol e 10 % (v/v) de tampão citrato de sódio pH 6 (10 mmol L<sup>-1</sup>).
- Nos dois casos (i e ii), a suspensão foi deixada sob agitação magnética por 1 hora a 25 °C para que a enzima fosse adsorvida pelo amido, sendo em seguida centrifugada nas condições já descritas. Ao precipitado contendo a CGTase adsorvida após a 1ª batelada ( $P_2$ ) adicionou-se água contendo 10 % (v/v) de etanol e 10 % (v/v) de tampão citrato de sódio pH 6 (10 mmol L<sup>-1</sup>), até completar 100 mL. Com essa suspensão iniciou-se a segunda batelada, conduzida a 65 °C por 24 horas, com amostragem nos tempos 0, 12 e 24 horas. O maior tempo de reação foi empregado no caso da segunda batelada, porque havia menor concentração de enzima no meio reacional, apenas aquela que foi adsorvida nos novos grânulos de amido. Após 24 horas de reação, a suspensão foi centrifugada. Foram retiradas amostras do sobrenadante contendo as CDs da 1ª batelada, após adsorção da CGTase ( $S_2$ ) e do sobrenadante resultante da 2ª batelada ( $S_3$ ) para a análise de CDs. Para as amostras retiradas durante o processo, utilizou-se o procedimento descrito no item 3.2.6.1.
- **Recuperação das CDs arrastadas nos precipitados  $P_1$  e  $P_3$ :** Nos processos com o

amido de milho, a centrifugação do volume reacional de 100 mL, após a primeira batelada produziu um precipitado ( $P_1$ ) com massa úmida média de 26,0 g ( $\cong$  5,0 g de massa seca) e, após a segunda batelada,  $P_3$ , com massa úmida média de 34,0 g ( $\cong$  6,5 g de massa seca), gerando uma perda de CDs nesses precipitados de 12 a 15 % em cada um deles. Para a recuperação dessas CDs, fez-se um experimento dissolvendo-se o precipitado com água destilada ou água destilada contendo 10 % (v/v) de etanol e 10 % (v/v) de tampão citrato de sódio pH 6 (10 mmol L<sup>-1</sup>) num volume total de 100 mL, deixando-se sob agitação magnética a 25 °C, pelos tempos de 30 minutos, 1, 2 ou 3 horas. Constatou-se que o tempo de 30 minutos, com apenas água destilada foi eficiente para a extração dessas CDs, que foram então recuperadas no sobrenadante após nova centrifugação. Essa etapa do processo está representada no fluxograma mostrado na Figura 3.4, após a linha pontilhada horizontal. Para o amido de mandioca essa etapa não foi necessária, uma vez que após a centrifugação o valor obtido de  $P_1$  foi em média de 0,5 g de massa seca e o de  $P_3$  foi em média de 1 g e conseqüentemente, a quantidade arrastada de CDs foi muito pequena.

- Os precipitados  $P_4$  e  $P_5$ , resultantes da recuperação das CDs contidas em  $P_1$  e  $P_3$  respectivamente, apresentaram apenas traços de CDs e num processo industrial esse material contendo principalmente amido e malto-oligossacarídeos não convertidos em CDs poderia ser seco e aproveitado para algum processo alternativo, ou mesmo adicionado ao amido no início de uma nova batelada.
- No cálculo do rendimento do processo com duas bateladas sequenciadas, foram consideradas as CDs presentes no sobrenadante da primeira batelada após a adsorção da enzima no amido, as que estavam presentes no sobrenadante final após a segunda batelada e, para o amido de milho, também as recuperadas dos precipitados  $P_1$  e  $P_3$ . Para o processo de uma única batelada consideraram-se as CDs presentes no sobrenadante e, para o amido de milho, também as recuperadas do precipitado  $P_1$  após centrifugação.
- O aumento no rendimento do processo com duas bateladas sequenciadas em relação ao processo com batelada única ( $R_{bu}$ ) é obtido pela Equação 3.5, onde a soma das CDs  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  produzidas em duas bateladas sequenciadas é  $CD_2$  e em uma única batelada é  $CD_1$ . O rendimento em relação ao amido utilizado ( $R_a$ ) é calculado pela Equação 3.6, onde  $CDsL$  é a massa de CDs em solução e  $Ma$  é a massa de amido utilizada, que foi dobrada no caso das duas bateladas sequenciadas.



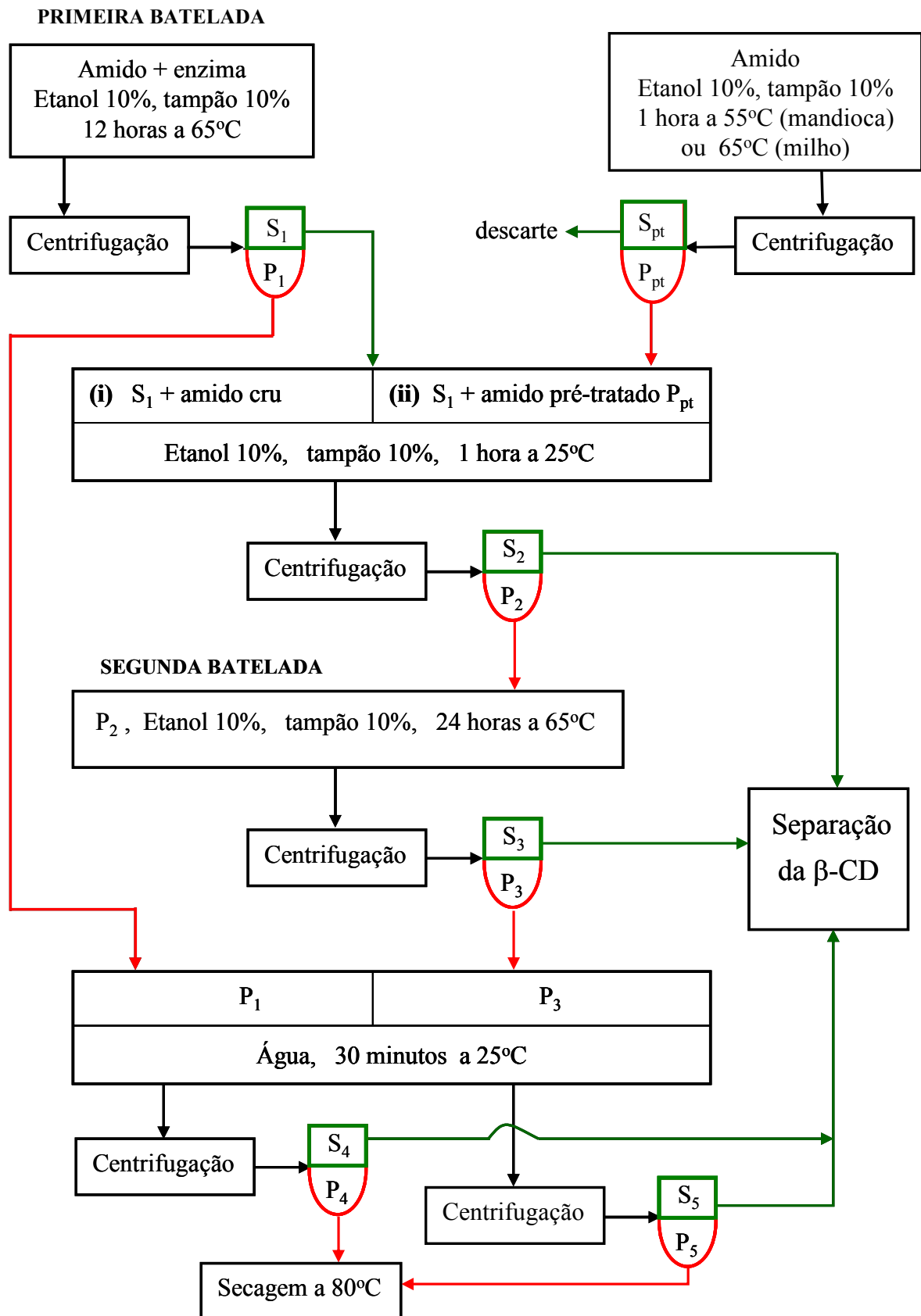


Figura 3.4 – Fluxograma dos procedimentos utilizados na produção de CDs em bateladas sequenciadas e com recuperação das CDs dos precipitados. Para as etapas de centrifugação utilizou-se 30 °C, 20 minutos, 12000 x g.

$$R_{bu} = \frac{(CD_2 - CD_1)}{CD_1} \times 100\% \quad (3.5)$$

$$R_a = \frac{CDsL}{Ma} \times 100\% \quad (3.6)$$

### 3.2.10 Produção de CDs em bateladas sequenciadas, com posterior separação da $\beta$ -CD por cristalização

Nesta etapa do trabalho, procedeu-se conforme metodologia descrita no item 3.2.9 (fluxograma mostrado na Figura 3.4) para a produção de CDs e na sequência, a cristalização e separação da  $\beta$ -CD produzida foi efetuada utilizando-se a metodologia simplificada descrita no item 3.2.8 (fluxograma mostrado na Figura 3.3). Os experimentos foram realizados utilizando-se o amido de milho ou a fécula de mandioca como substratos.

Estes procedimentos foram aplicados para os seguintes processos:

- Uma batelada (1B)
- Duas bateladas sem pré-tratamento do amido para a segunda batelada (2B)
- Duas bateladas com pré-tratamento do amido para a segunda batelada (2BP)
- Uma batelada sem etanol (1B-SE)
- Duas bateladas com pré-tratamento do amido para a segunda batelada, sem etanol (2BP-SE)

Os resultados estão apresentados no item 4.6.

### 3.2.11 Recristalização da $\beta$ -CD

O objetivo do processo de recristalização é obter a  $\beta$ -CD com maior grau de pureza, uma vez que na primeira cristalização precipitam juntamente com a  $\beta$ -CD, outras CDs formadas, assim como frações não convertidas do amido presentes na solução.

### 3.2.11.1 Ensaio com recristalização a partir de um processo de produção de CDs com batelada única

Nesta etapa do trabalho, estudou-se a cristalização da  $\beta$ -CD a partir de um processo de produção com batelada única, nas condições previamente definidas com o amido de milho e posteriormente realizando-se uma recristalização e duas cristalizações sucessivas a partir do sobrenadante resultante da recristalização, com reduções progressivas do volume do sobrenadante após cada etapa de cristalização, com o objetivo de se verificar a pureza do produto cristalizado à medida que se concentra a solução, atingindo o limite de solubilidade das CDs. O procedimento está descrito abaixo e é apresentado de forma simplificada na Figura 3.5

- Inicialmente, utilizando-se um volume reacional de 500 mL, produziu-se CDs em um processo de batelada única, cristalizando e precipitando as CDs obtidas (a partir de  $S_1$ ), seguindo o procedimento descrito no fluxograma representado na Figura 3.3, até o ponto em que o precipitado final úmido contendo as CDs cristalizadas, foi obtido por centrifugação. Retirou-se uma alíquota de 0,5 g desse precipitado para determinar sua umidade e portanto conhecer sua massa seca, determinando-se assim o primeiro precipitado cristalizado ( $Pc_1$ ). Reservou-se o sobrenadante ( $Sa$ ) em geladeira.
- Esse precipitado úmido ( $Pc_1$ ) foi então dissolvido em 500 mL de água destilada e deixado sob agitação magnética a 60 °C por 5 minutos para dissolver completamente e alcançar a homogeneização.
- A solução foi então resfriada a 30 °C, centrifugada (30 °C, 15 min, 12000 x g) e filtrada a vácuo com papel de filtro de passagem lenta.
- Reduziu-se o volume dessa solução até 100 mL, utilizando-se um rotaevaporador a 80 °C e vácuo de 750 mmHg.
- Essa solução foi resfriada até 50 °C sob agitação magnética, utilizando-se em seguida o procedimento descrito no fluxograma representado na Figura 3.3, a partir do ponto marcado com o símbolo  $\Downarrow$ , obtendo-se o precipitado recristalizado ( $Prc_1$ ).
- O processo de redução do volume, cristalização e secagem do precipitado foi repetido duas vezes com o sobrenadante ( $Sb$ ) resultante da obtenção do precipitado recristalizado  $Prc_1$ : (i) reduzindo o volume para 60 mL, obtendo-se  $Sc$  e  $Prc_2$ ; (ii) reduzindo o volume de  $Sc$  para 30 mL, obtendo-se o  $Prc_3$  e descartando-se  $Sd$ .

- Efetuou-se ainda o procedimento de cristalização e precipitação para o sobrenadante  $S_a$  que havia sido reservado no início do processo, resultando no segundo precipitado cristalizado ( $Pc_2$ ) e sendo descartado o sobrenadante  $S_e$ .
- Foram preparadas soluções de 0,1 g/500 mL para  $Pc_1$ , e de 0,1 g/100 mL para os demais precipitados obtidos, para serem analisados por CLAE.

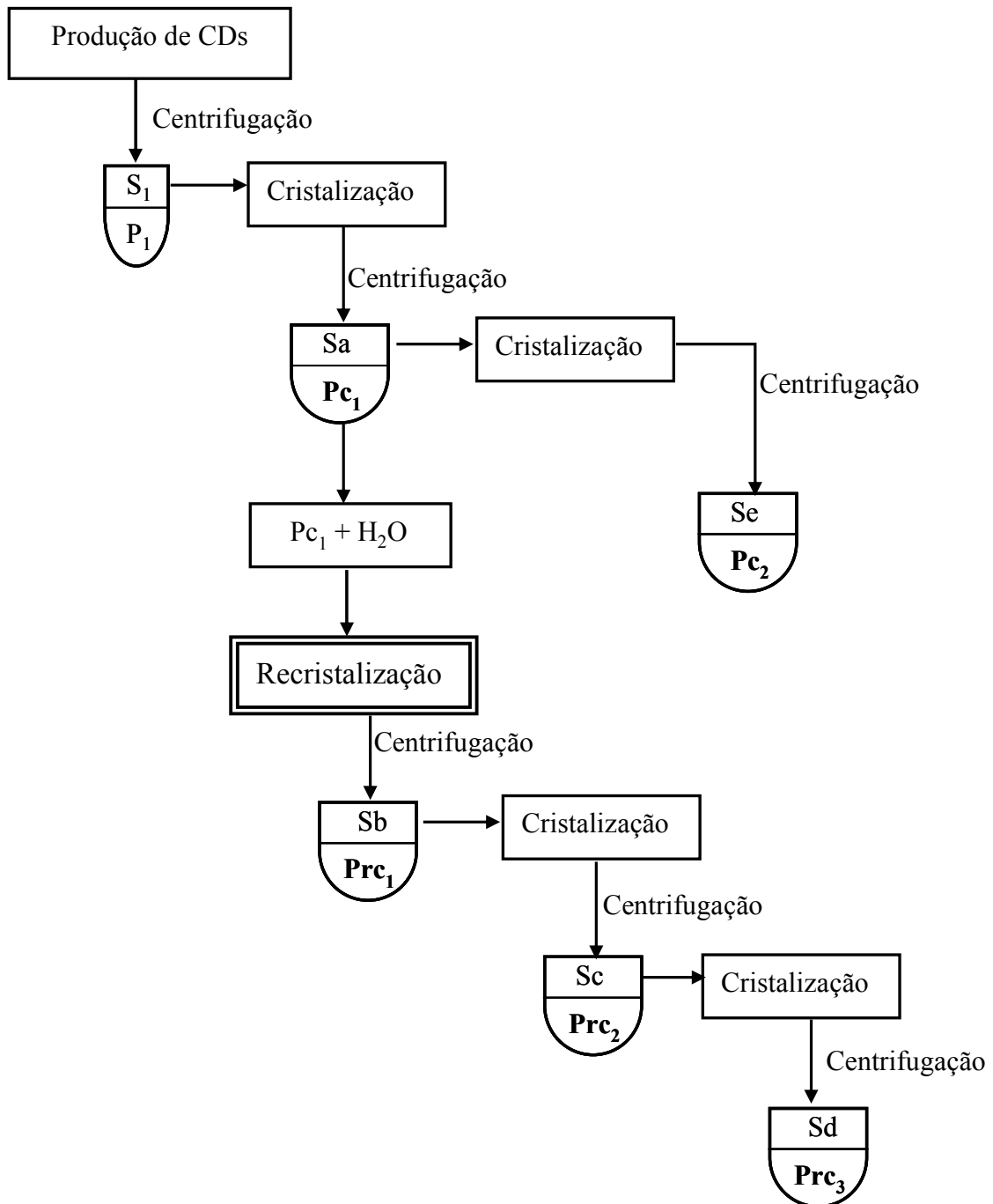


Figura 3.5 – Fluxograma simplificado da cristalização e recristalização de CDs a partir de um processo de produção de CDs com batelada única.

### 3.2.11.2 Ensaio com recristalizações de precipitados produzidos a partir de processos com bateladas sequenciadas

- Para a recristalização da  $\beta$ -CD produzida num volume de reação de 100 mL, o precipitado obtido por cristalização no procedimento de bateladas sequenciadas, que possuía um alto grau de impurezas, foi dissolvido num volume de 200 mL, com água destilada. A solução foi aquecida a 60 °C, sob agitação magnética, por 5 minutos para a dissolução total do material.
- A solução foi então resfriada a 30 °C, centrifugada (30 °C, 15 min, 12000 x g) e filtrada a vácuo com papel de filtro de passagem lenta.
- Manteve-se a solução a 85 °C para redução do volume até 50 mL, em seguida resfriando-a até 50 °C sob agitação magnética e utilizando-se o procedimento descrito no fluxograma mostrado na Figura 3.3, a partir do ponto marcado com o símbolo  $\Downarrow$ , obtendo-se o precipitado recristalizado.
- Foi preparada uma solução de 0,1 g/100 mL com os cristais obtidos, para ser analisada por CLAE.

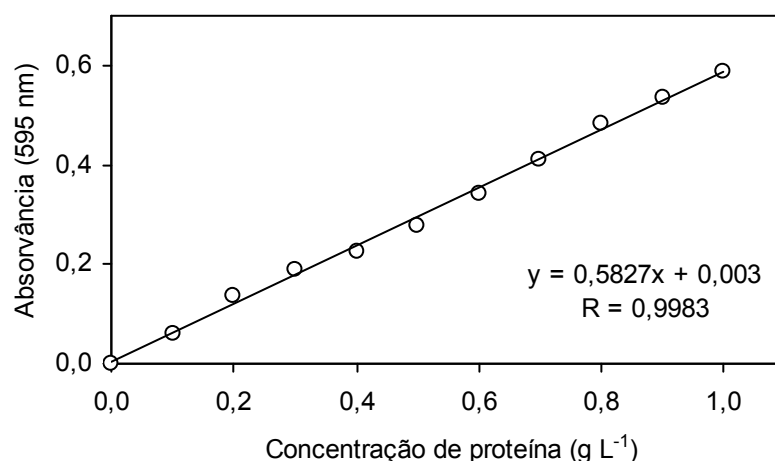
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos são apresentados e analisados neste capítulo.

### 4.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

#### 4.1.1 Dosagem de Proteína pelo Método de Bradford

A Figura 4.1 mostra o ajuste linear da absorvância determinada em 595 nm em função da concentração de proteína, conforme metodologia descrita no item 3.2.1. A concentração média de proteína da preparação comercial de CGTase (Toruzyme®) obtida por esse método foi de 5,65 g L<sup>-1</sup>.



**Figura 4.1 – Reta ajustada para a determinação do teor de proteína, pelo método de Bradford (y = absorvância, x = concentração de proteína).**

#### 4.1.2 Determinação de glicose pelo método GOD-POD

A Figura 4.2 mostra o ajuste linear de absorvância medida em 505 nm, em função da concentração de glicose. Foi utilizado o método GOD-POD (item 3.2.2).

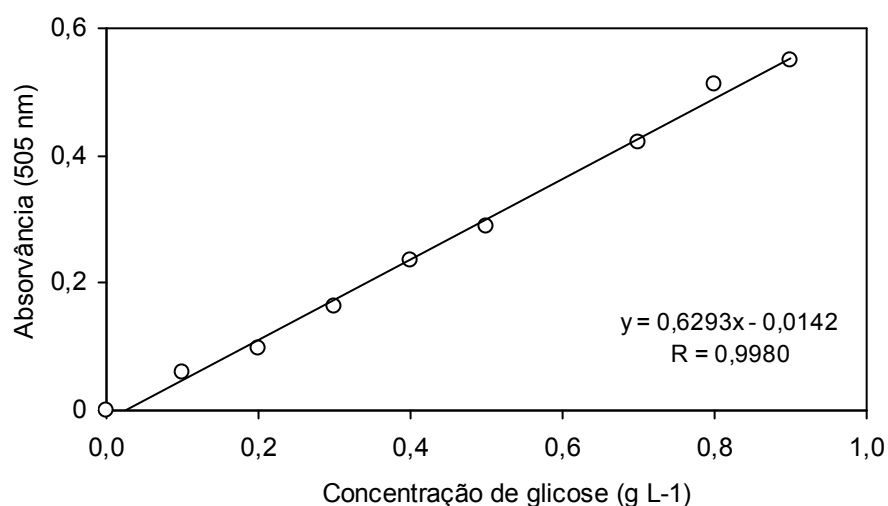


Figura 4.2 – Retra ajustada para a determinação de glicose pelo método GOD-POD ( $y =$  absorvância,  $x =$  concentração de glicose).

#### 4.1.3 Determinação da $\beta$ -ciclodextrina pelo método colorimétrico da fenolftaleína

De acordo com o procedimento descrito no item 3.2.3, na Figura 4.3 é apresentado o ajuste não-linear de absorvância em função da concentração de  $\beta$ -CD. O ajuste a partir da Equação 3.1 gerou a Equação 4.1. O valor obtido para a constante  $k$  ( $20955,96 \text{ L mol}^{-1}$ ) está de acordo com valores reportados em trabalhos anteriores, entre  $17400$  e  $22507 \text{ L mol}^{-1}$  (SOBRAL, 2002; TARDIOLI *et al.*, 2006; BERGAMASCO, 2007; LINDE, 2008).

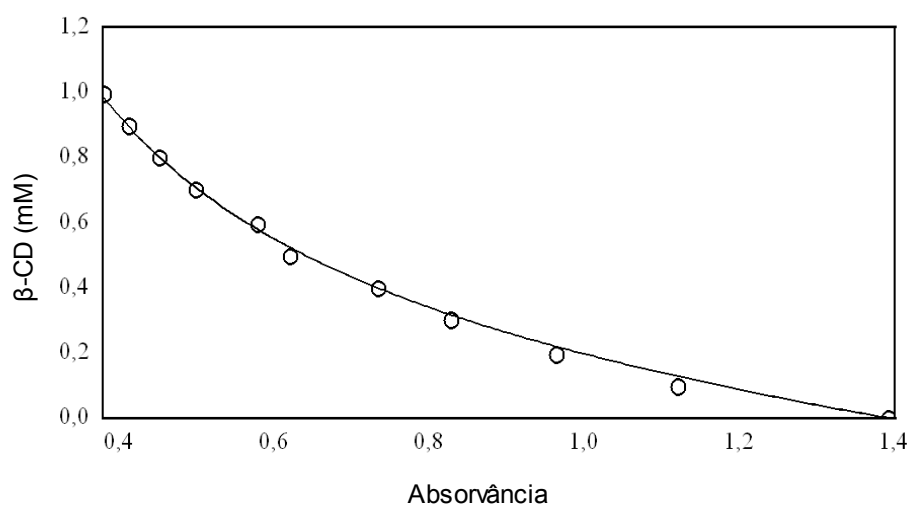


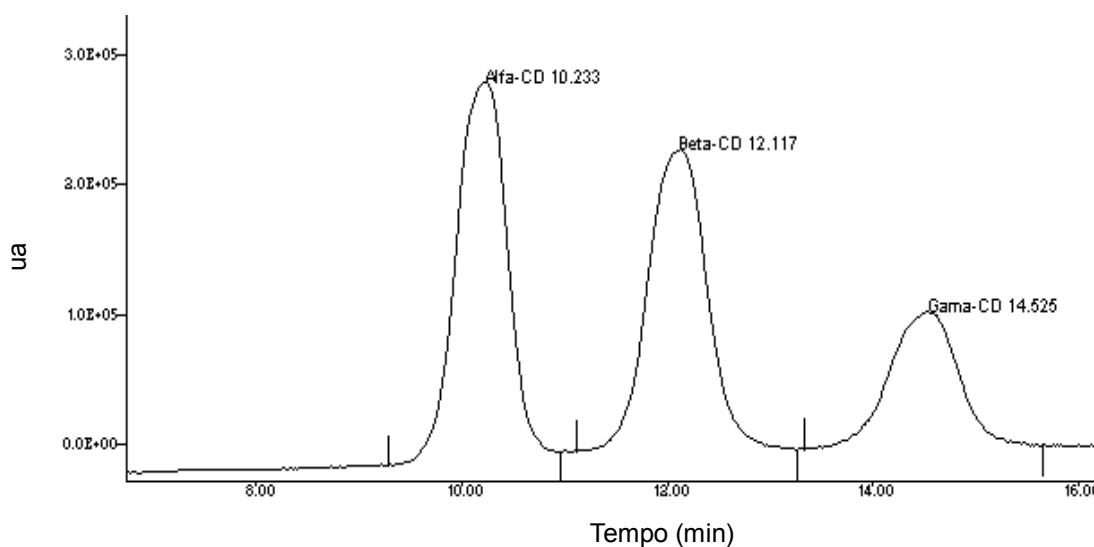
Figura 4.3 – Ajuste dos dados de absorvância a 550 nm em função da concentração de  $\beta$ -CD em  $\text{mmol L}^{-1}$ .

$$C_{\beta\text{-CD}} = 0,3 \left[ 1 - \frac{\text{ABS}}{1,393} \right] \left[ 1 + \frac{1,393}{5.10^{-5} (20955,96 \text{ ABS})} \right] \quad (4.1)$$

$$R = 0,9985$$

#### 4.1.4 Determinação das ciclodextrinas por cromatografia líquida de alta eficiência

Na Figura 4.4 é apresentado o cromatograma de um dos padrões analisados por CLAE, contendo as três ciclodextrinas. Observa-se que nas condições de análise empregadas, as ciclodextrinas foram separadas de maneira satisfatória. Os padrões de  $\gamma$ -CD foram preparados com a metade da concentração de  $\alpha$  e  $\beta$ , para se aproximar das condições das amostras a serem analisadas, uma vez que a enzima empregada produz pouca  $\gamma$ -CD. Na Tabela 4.1 e Figura 4.5 são apresentadas as curvas padrão (retas ajustadas) utilizadas na determinação das CDs contidas nas amostras analisadas por CLAE.



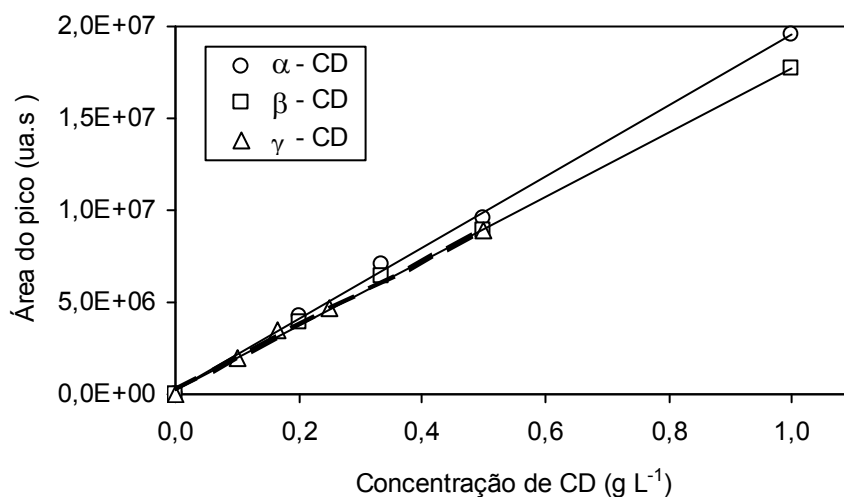
**Figura 4.4 – Cromatograma de um padrão contendo 0,5 g L<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -CD, 0,5 g L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD e 0,25 g L<sup>-1</sup> de  $\gamma$ -CD. Análise por CLAE: coluna Microsorb-MV, 100-5, Amino 250x4; fase móvel acetonitrila 65 % e água 35 % na vazão de 0,7 mL min<sup>-1</sup>, temperatura ambiente; detetor IR, atenuação 1.**

#### 4.2 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TRABALHO

De acordo com a literatura consultada (item 3.2.6.2), os experimentos foram



realizados com o amido na concentração de 15 % (m/v), temperatura de 65 °C e pH 6. Neste item serão discutidos os resultados obtidos na determinação da fração do amido pré-tratado que sofre a ação da enzima Toruzyme®, bem como das concentrações dessa enzima e de etanol a serem empregadas nas reações de produção de CDs.



**Figura 4.5 – Curvas-padrão das ciclodextrinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , a partir das áreas dos picos dos cromatogramas, conforme Tabela 4.1.**

**Tabela 4.1 – Determinação das curvas padrão das ciclodextrinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , a partir das áreas dos cromatogramas. Concentração de ciclodextrina = x, área do pico = y, coeficiente de correlação da reta ajustada = R.**

Concentração da CD (g L <sup>-1</sup> )	Área do cromatograma (ua.s)		
	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
0,0000	0	0	0
0,1000			1.937.620
0,1667			3.476.299
0,2000	4.191.906	3.896.929	
0,2500			4.634.422
0,3333	7.068.801	6.397.802	
0,5000	9.587.799	8.956.646	8.894.391
1,0000	19.573.879	17.670.800	
Retas ajustadas (Figura 4.5)	$y = 19372167x + 206591$ R = 0,9993	$y = 17495036x + 269904$ R = 0,9995	$y = 17604960x + 208754$ R = 0,9981

#### 4.2.1 Fração do amido pré-tratado que sofre a ação da Toruzyme®

Na Figura 4.6 estão apresentados os resultados obtidos ao utilizar-se independentemente como substrato para a enzima Toruzyme®, tanto os grânulos pré-tratados do amido extraído por centrifugação da suspensão de pré-tratamento, como o sobrenadante após a centrifugação. O procedimento está descrito no item 3.2.6.3.

Com o resultado apresentado na Figura 4.6 concluiu-se que a enzima atua nos grânulos pré-tratados do amido e que na fração sobrenadante não ocorre formação de  $\beta$ -CD.

Realizou-se adicionalmente um teste para determinar o amido residual no sobrenadante após o pré-tratamento e centrifugação. O teste consistiu em secar o sobrenadante em estufa a 80 °C até massa constante. A massa que sobrou de amido foi de apenas 0,2613 g. Ou seja, de 15 g de amido presentes inicialmente no pré-tratamento, 14,7387 g ficaram no precipitado da centrifugação, justificando assim o fato de haver uma formação desprezível de ciclodextrina no sobrenadante.

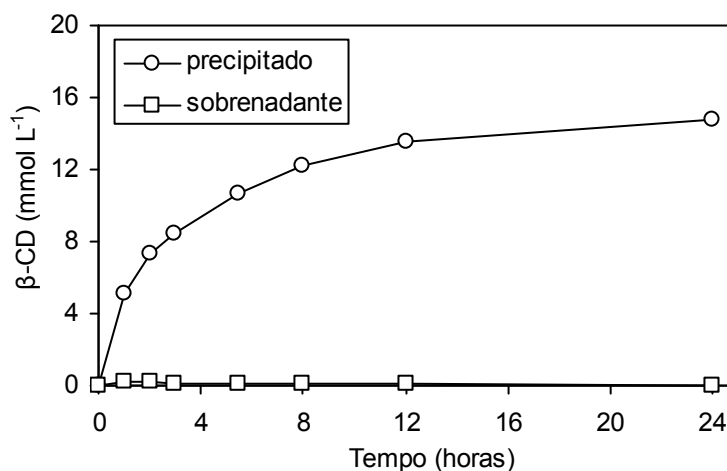
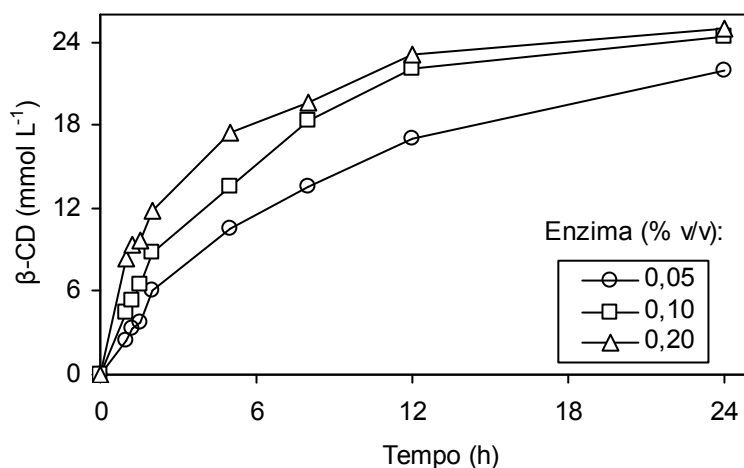


Figura 4.6 – Produção de CDs a 65 °C, pH 6, 15 % (v/v) de etanol, a partir do precipitado e do sobrenadante resultantes do pré-tratamento do amido de milho 15 % (m/v) a 65 °C e posterior centrifugação. Determinação da  $\beta$ -CD pelo MCFE.

#### 4.2.2 Variação da concentração de enzima com etanol a 15 % (v/v)

Inicialmente foram realizados ensaios fixando-se em 15 % (v/v) a concentração de etanol e variando-se a concentração de enzima. Na Figura 4.7, observa-se um aumento na produção de  $\beta$ -CD à medida que se aumenta a concentração de enzima no meio reacional. No entanto, ao utilizar-se 0,2 % (v/v) de enzima ao invés de 0,1 %, o aumento da produção de  $\beta$ -

CD observado foi de apenas 4,23 % após 12 horas de reação e de 4,68 % após 24 horas. Devido ao elevado custo da enzima, decidiu-se pela concentração de 0,1 %. Quanto à concentração de 0,05 % (v/v), além do rendimento inferior observado, devido à baixa concentração da enzima no meio reacional, a suspensão permanecia viscosa por um tempo maior, dificultando a agitação da mesma.



**Figura 4.7 – Produção de CDs com amido de milho 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, 15 % (v/v) de etanol, variando-se a concentração de enzima CGTase. Determinação da  $\beta$ -CD pelo MCFE.**

Para a concentração de 0,1 % (v/v) de enzima, as amostras foram também analisadas por CLAE. Os resultados são apresentados na Figura 4.8. Observa-se que a maior produção após 24 horas foi da  $\alpha$ -CD (36,59 mmol L<sup>-1</sup>), enquanto a da  $\beta$ -CD foi de 21,29 mmol L<sup>-1</sup> e a menor foi a da  $\gamma$ -CD (2,55 mmol L<sup>-1</sup>). Para o tempo de reação de 24 horas, houve um aumento de apenas 2,70 % de  $\alpha$ -CD, 4,67 % de  $\beta$ -CD e nenhum aumento de  $\gamma$ -CD em relação ao tempo de 12 horas.

Na Figura 4.9 é feita a comparação entre os métodos de dosagem de  $\beta$ -CD (MCFE e CLAE). Observa-se que os dois métodos apresentaram resultados bem aproximados, com variações de 1 a 15 %, sendo o método CLAE mais eficiente por separar as CDs em picos distintos, enquanto no método colorimétrico pode ocorrer interferência tanto pela encapsulação de uma pequena porção da fenolftaleína nas outras CDs quanto por uma eventual turbidez na solução. Portanto, utilizou-se o MCFE para todos os experimentos por ser mais rápido e barato e a CLAE apenas para os experimentos em que se desejava comparar também a produção das  $\alpha$ - e  $\gamma$ - CDs.

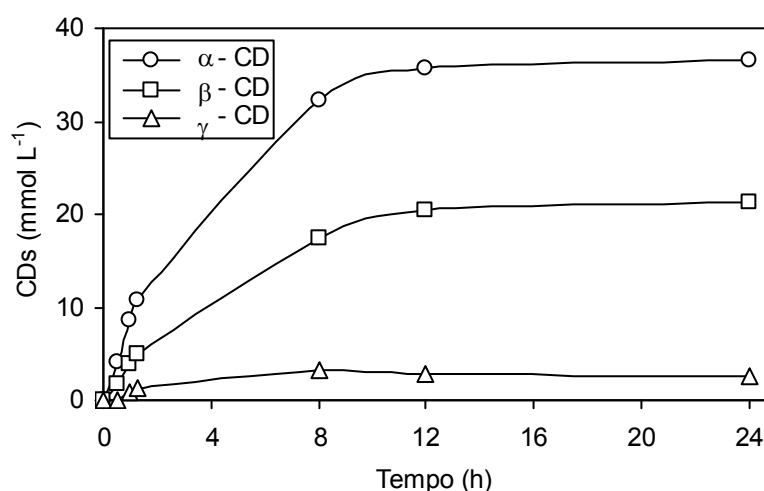


Figura 4.8 – Produção de CDs com amido de milho 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, 15 % (v/v) de etanol e 0,1 % (v/v) de enzima CGTase. Amostras analisadas por CLAE.

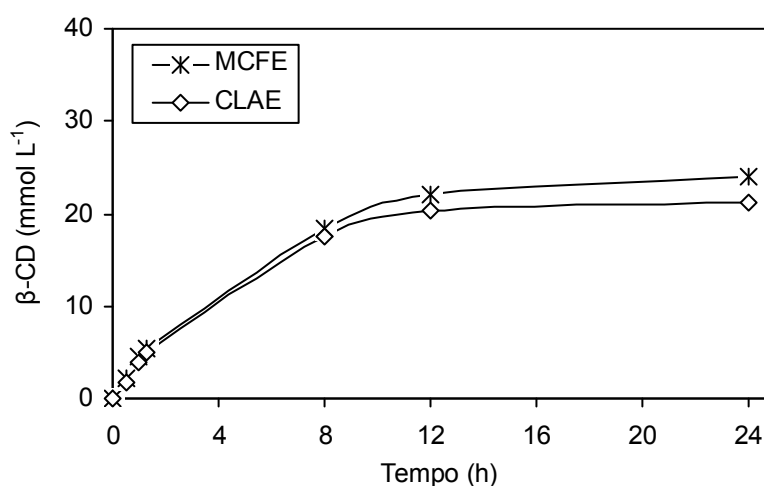


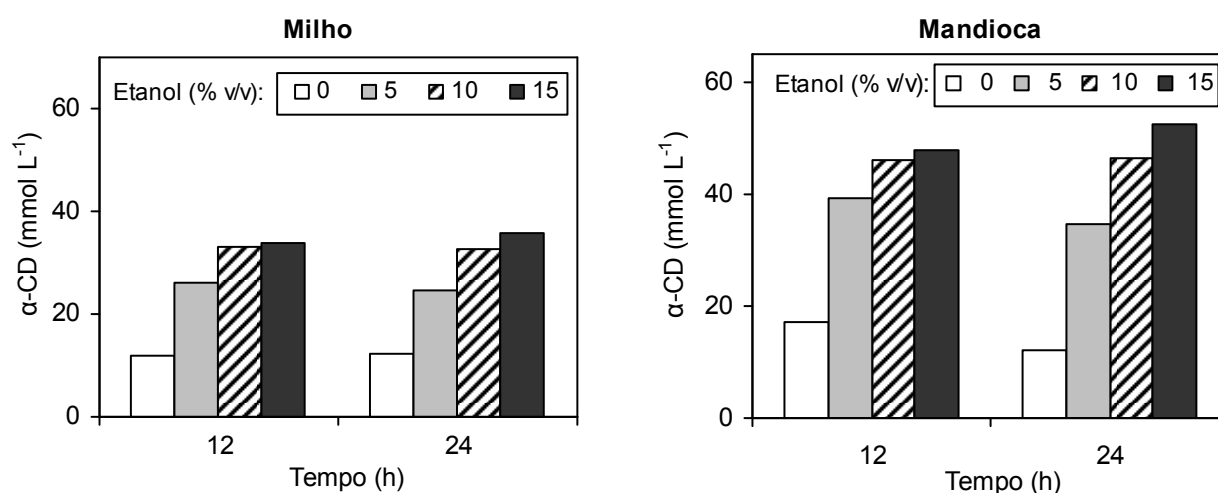
Figura 4.9 – Comparação entre os métodos de dosagem de β-CD (MCFE e CLAE). Utilizou-se amido de milho 15 % (m/v), 15 % (v/v) de etanol, 65 °C, pH 6 e 0,1 % (v/v) de CGTase na produção de CDs.

#### 4.2.3 Variação da concentração de etanol com enzima a 0,1 % (v/v)

Nas Figuras 4.10 e 4.11 são apresentados os resultados obtidos com a variação do teor de etanol adicionado ao substrato. Observa-se uma maior produção de α-CD e β-CD para as concentrações de etanol de 10 e 15 % (v/v). Após 12 horas de reação, utilizando-se 10 % (v/v) de etanol, houve um aumento moderado na produção de β-CD (em torno de 18 % com amido de milho e 21 % com o de mandioca) e expressivo acréscimo na produção de α-CD, que praticamente triplicou, em relação ao teste sem etanol. Optou-se pela concentração de 10 %

(v/v) de etanol, uma vez que para a concentração de 15 % (v/v) houve uma pequena redução na produção de  $\beta$ -CD e um aumento pouco significativo na produção de  $\alpha$ -CD, quando comparadas com a concentração de 10 % (v/v) de etanol. A produção total de CDs sem etanol foi de 34,68 mmol L<sup>-1</sup> para o milho e 42,45 mmol L<sup>-1</sup> para a mandioca e na presença de 10 % (v/v) de etanol foi de 58,88 mmol L<sup>-1</sup> para o milho e 76,58 mmol L<sup>-1</sup> para a mandioca, o que significou um aumento na produção, de 69,8 % com o amido de milho e 80,4 % com o de mandioca, pela utilização do etanol. Para a  $\gamma$ -CD, independente da concentração de etanol empregada e do substrato, a produção foi muito baixa (em torno de 4 mmol L<sup>-1</sup>).

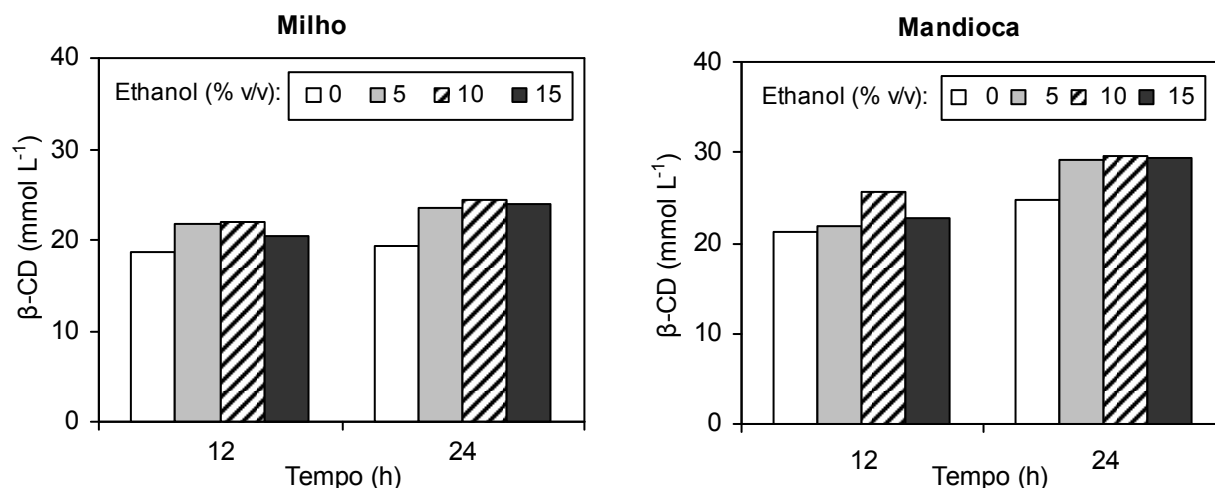
A comparação das Figuras 4.10 e 4.11 mostra que a cinética de produção das CDs se transforma de uma produção mais rápida de  $\alpha$  e  $\beta$ -CD, na ausência de etanol, para uma produção muito mais rápida de  $\alpha$ -CD na presença de etanol, ou seja, o comportamento da enzima muda de  $\alpha\beta$ - para  $\alpha$ -CGtase, com a adição de 10 % de etanol ao meio de reação.



**Figura 4.10** – Efeito de diferentes concentrações de etanol na produção de  $\alpha$ -CD, com amido 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6 e 0,1 % (v/v) de enzima. Amostras analisadas por CLAE.

O aumento da produção de CDs na presença de etanol, bem mais significativo para a  $\alpha$ -CD, está de acordo com os resultados obtidos por Blackwood e Bucke (2000). Esses autores usaram amido de batata parcialmente hidrolisado como substrato. Mattsson *et al.* (1991) observaram um aumento na produção de  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD, com redução de  $\alpha$ -CD, à medida que aumentaram a concentração de etanol no meio reacional tendo sido o efeito do etanol similar para várias fontes de amido testadas. Mori *et al.* (1995), usando amido solúvel, obtiveram maiores rendimentos de  $\gamma$ -CD na presença de etanol. Estes dois últimos grupos de

autores trabalharam com enzimas CGTases diferentes da Toruzyme®, podendo-se concluir portanto, que a influência do etanol na formação das CDs é dependente da enzima empregada nos ensaios. Considerando-se os resultados dos trabalhos de Kim *et al.*, 1997, Uitdehaag *et al.* (2000) e Kelly *et al.* (2009), pode-se atribuir a ação do etanol a alterações no microambiente dos subsítios do sítio ativo da CGTase, de forma a mudar a especificidade da produção das ciclodextrinas.

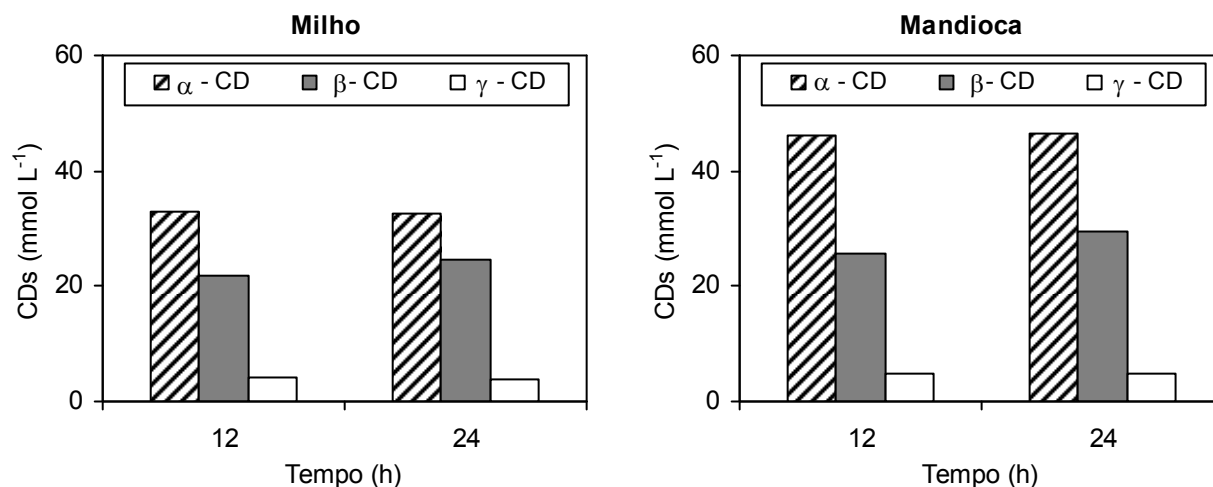


**Figura 4.11 – Efeito de diferentes concentrações de etanol na produção de  $\beta$ -CD, com amido 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6 e 0,1 % (v/v) de enzima. Amostras analisadas por CLAE. Concentração de etanol (% (v/v)): 0 (●), 5 (○), 10 (□) e 15 (Δ).**

Na Figura 4.12 são apresentadas as curvas de produção de CDs em função do tempo, nas condições selecionadas de concentração de etanol (10 % (v/v)) e de enzima (0,1 % (v/v)). Para o tempo de reação de 24 horas, não houve aumento significativo na produção das CDs em relação ao tempo de 12 horas. Para 12 horas de reação, com o amido de milho, produziu-se 32,92 mmol L<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -CD, 21,96 mmol L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD e 4,00 mmol L<sup>-1</sup> de  $\gamma$ -CD, enquanto com o amido de mandioca produziu-se 46,16 mmol L<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -CD, 25,67 mmol L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD e 4,75 mmol L<sup>-1</sup> de  $\gamma$ -CD. A produção total de CDs foi de 58,88 mmol L<sup>-1</sup> com o amido de milho e de 76,58 mmol L<sup>-1</sup> para o amido de mandioca como substratos. Ou seja, com o amido de mandioca, houve um aumento de cerca de 30 % na produção total de CDs em relação ao processo em que se empregou o amido de milho.

Também se analisou a possível perda de etanol durante a produção de CDs, que atrapalharia a comparação do rendimento para as diferentes concentrações de etanol testadas. Para isto, após 24 horas de reação, fez-se a análise das amostras do meio reacional por

cromatografia gasosa, que demonstrou não haver perda de etanol durante a reação.



**Figura 4.12 – Produção de CDs com amido 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, 0,1 % (v/v) de enzima e 10 % (v/v) de etanol. Amostras analisadas por CLAE.**

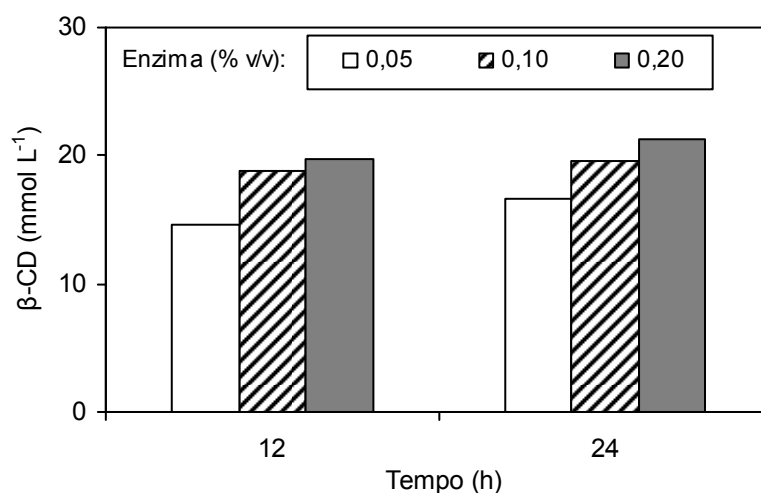
#### 4.2.4 Variação da concentração de enzima com etanol a 10 % (v/v)

Para o volume de etanol selecionado no item 4.2.3, que foi de 10 % (v/v), repetiu-se o ensaio em que se variou a concentração de enzima, utilizando-se o amido de milho. Pelos resultados apresentados na Figura 4.13, observa-se que realmente a concentração de 0,1 % (v/v) de enzima é vantajosa sobre a de 0,2 % pois com o dobro da enzima houve um aumento na produção de β-CD de apenas 5 % após 12 horas de reação e 9,2 % após 24 horas. Quanto à concentração de 0,05 % (v/v), novamente observou-se rendimento baixo e dificuldade na agitação, devido à viscosidade da suspensão do substrato.

### 4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CGTASE PELO MÉTODO DAS VELOCIDADES INICIAIS

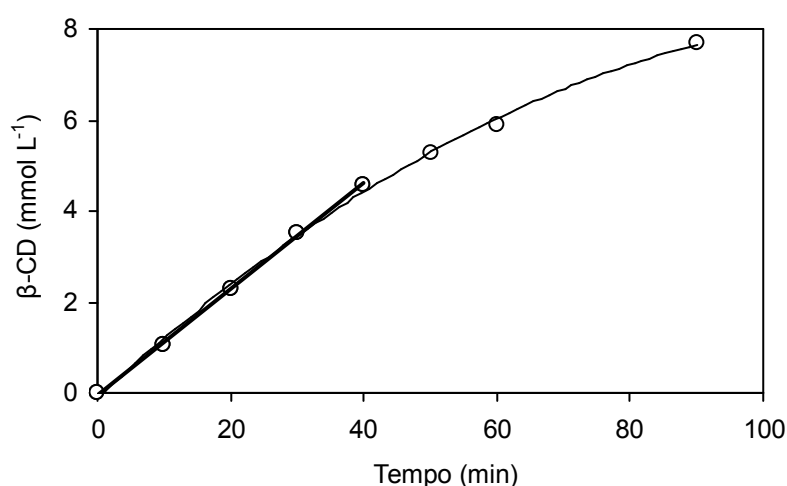
Este experimento foi feito apenas para o amido de milho como substrato. A metodologia aplicada está descrita no item 3.2.7. Na Figura 4.14 é apresentada a curva obtida para a produção de β-CD, com as amostras analisadas pelo MCFE. As amostras correspondentes aos pontos da região linear (0 a 40 minutos) foram também analisadas por CLAE e os resultados são apresentados na Figura 4.15 e Tabela 4.2, onde se pode observar que foram obtidas retas com elevados coeficientes de correlação para as três ciclodextrinas

formadas. Os coeficientes angulares obtidos a partir das retas ( $\Delta C/\Delta t$ ) foram aplicados na Equação 3.2, obtendo-se a atividade específica da enzima CGTase para a  $\alpha$ -CD, a  $\beta$ -CD e a  $\gamma$ -CD nessas condições de trabalho. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.2. O teor de proteína da enzima foi de  $5,65 \text{ g L}^{-1}$ , conforme determinado no item 4.1.1.



**Figura 4.13** – Produção de CDs com amido de milho 15 % (m/v), a  $65^\circ\text{C}$ , pH 6,0, 10 % (v/v) de etanol, variando-se a concentração de enzima CGTase. Determinação da  $\beta$ -CD pelo MCFE.

Na Tabela 4.2, observa-se que a produção inicial de  $\beta$ -CD é praticamente a metade da produção de  $\alpha$ -CD e pouco mais que o dobro da produção de  $\gamma$ -CD. A atividade específica da Toruzyme® por massa de proteína para as três CDs é de  $65,49 \text{ U mg}^{-1}$ .

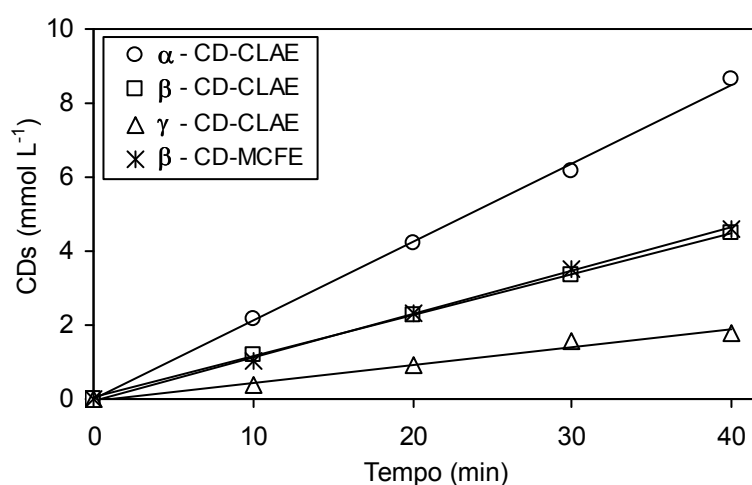


**Figura 4.14** – Produção de  $\beta$ -CD com amido de milho 15 % (m/v), a  $65^\circ\text{C}$ , pH 6, 10 % (v/v) de etanol, para aplicação do método das velocidades iniciais. Determinação da  $\beta$ -CD pelo MCFE.



**Tabela 4.2 – Atividade específica da enzima por massa de proteína ( $A_E$ ), determinada pelo método das velocidades iniciais, com as amostras analisadas por MCFE e CLAE.  $C$  = concentração de ciclodextrina ( $\text{mmol L}^{-1}$ ),  $t$  = tempo de reação (min),  $R$  = coeficiente de correlação.**

CD produzida	Método de análise	Equação da reta ajustada	R	$A_E$ ( $\text{U mg}^{-1}$ )
$\alpha$ -CD	CLAE	$C = 0,2103 t + 0,0090$	0,9997	37,25
$\beta$ -CD	CLAE	$C = 0,1107 t + 0,0367$	0,9998	19,61
$\gamma$ -CD	CLAE	$C = 0,0487 t + 0,0332$	0,9917	8,63
$\beta$ -CD	MCFE	$C = 0,1168 t - 0,0388$	0,9995	20,68



**Figura 4.15 – Produção de CDs com amido de milho 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, 10 % (v/v) de etanol, para aplicação do método das velocidades iniciais. Determinação das CDs por CLAE e MCFE.**

#### 4.4 PRODUÇÃO DE CDS COM BATELADA ÚNICA E SEPARAÇÃO DA $\beta$ -CD PRODUZIDA POR CRISTALIZAÇÃO E PRECIPITAÇÃO

Na Tabela 4.3 são apresentados os resultados obtidos em testes de produção de CDs com batelada única e separação da  $\beta$ -CD produzida por cristalização e precipitação, conforme metodologia descrita no item 3.2.8. Este experimento foi conduzido apenas com o amido de milho. Observa-se que a utilização da enzima AMG (experimentos 1 e 2), não aumentou o grau de pureza do precipitado obtido pois a glicose formada a partir dos malto-oligossacarídeos presentes, precipitou junto com as CDs. A presença de cristais de  $\beta$ -CD como semente (experimento 1), não se mostrou vantajosa em relação aos experimentos em que os mesmos não foram utilizados. Apesar do experimento 4, que foi o mais simplificado,

ter apresentado o melhor resultado em termos de produção e rendimento, optou-se por empregar o processo do experimento 3, pois o carvão ativado retira os resíduos enzimáticos e outras possíveis impurezas. Visualmente, observou-se que o precipitado obtido com o carvão apresentou cor mais clara do que na ausência do mesmo. Assim, para os demais experimentos, foi adotado o fluxograma simplificado, conforme apresentado na Figura 3.3, onde foram excluídas as etapas em que se utilizou a enzima AMG e os cristais de  $\beta$ -CD como semente.

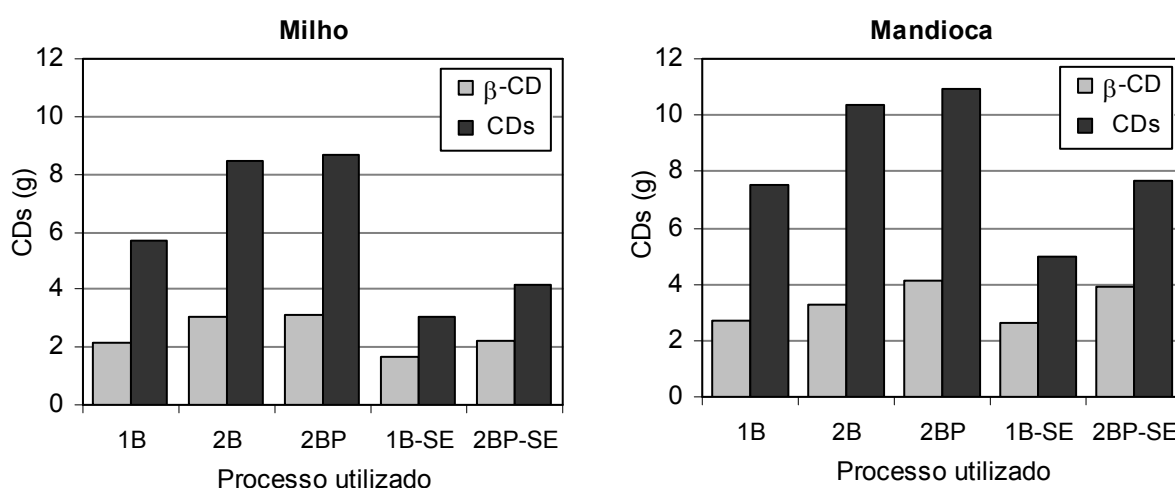
**Tabela 4.3 – Composição do precipitado contendo as CDs produzidas e cristalizadas, analisado por CLAE. Pp = precipitado obtido, Glic = glicose, ANC = amido não convertido em CDs, CDs = ( $\alpha$ -CD +  $\beta$ -CD), RaCDs = rendimento de CDs produzidas em relação ao amido de milho utilizado, Ra $\beta$  = rendimento em  $\beta$ -CD produzida em relação ao amido de milho.**

Experimento	Pp (g)	Composição do Pp										Rendimentos	
		(%)					(g)					RaCDs (%)	Ra $\beta$ (%)
		$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	Glic	ANC	CDs	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	Glic	ANC	CDs		
1 Procedimento completo	3,5	10,65	60,16	21,56	7,63	70,81	0,37	2,11	0,76	0,27	2,48	6,61	5,61
2 Sem semente	3,0	13,24	61,39	15,34	10,03	74,63	0,40	1,84	0,46	0,30	2,24	5,97	4,91
3 Sem AMG e semente	3,3	13,38	62,18	-	24,44	75,56	0,44	2,05	-	0,81	2,49	6,65	5,47
4 Sem AMG, carvão e semente	3,5	11,50	60,70	-	27,81	72,20	0,40	2,12	-	0,97	2,52	6,74	5,66

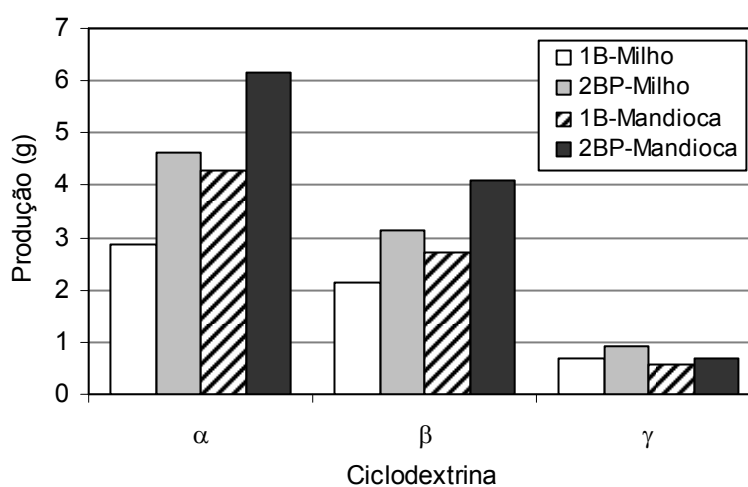
#### 4.5 PRODUÇÃO DE CDS EM BATELADAS SEQUENCIADAS

Nas Tabelas 4.4 e 4.5 e Figuras 4.16 e 4.17 são apresentados os resultados dos ensaios de produção de CDs em duas bateladas sequenciadas realizados conforme metodologia descrita no item 3.2.9, para os amidos de milho e de mandioca. Observa-se que foi vantajoso empregar-se duas bateladas sequenciadas em relação ao processo com uma única batelada, tendo sido maior o rendimento para o processo com pré-tratamento do amido para a segunda batelada, na presença de 10 % (v/v) de etanol: para o amido de milho, o aumento na produção de CDs foi de 57,43 %, enquanto para o amido de mandioca foi de 43,70 %. Em relação ao processo com batelada única sem etanol (1B-SE), a produção de CDs aumentou em 184 % com o amido de milho e em 120 % com o de mandioca. A maior produção ocorreu com o

amido de mandioca (10,95 g de CDs), tendo sido 26 % maior do que com o amido de milho (8,69 g de CDs). Na batelada única, com amido de mandioca, a produção de CDs foi 33 % maior do que com o amido de milho. Com relação à presença de etanol, para o amido de milho, a produção de CDs na presença de 10 % (v/v) de etanol (2BP) dobrou quando comparada com o processo sem etanol (2BP-SE). Já para o amido de mandioca o aumento foi de 42 %, indicando que a influência do etanol no aumento da produção de CDs foi maior para o amido de milho, nos processos com duas bateladas sequenciadas.



**Figura 4.16 – Produção de CDs com amido de milho ou mandioca 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, pelos processos: 1B = uma única batelada, 2B = duas bateladas sem pré-tratamento, 2BP = duas bateladas com pré-tratamento, 1B-SE = uma única batelada sem etanol, 2BP-SE = duas bateladas com pré-tratamento, sem etanol.**



**Figura 4.17 – Produção de CDs com amido de milho ou mandioca 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, etanol 10 % (v/v), pelos processos: 1B = uma única batelada e 2BP = duas bateladas com pré-tratamento.**

**Tabela 4.4 – Produção de CDs com amido de milho 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, pelos processos: 1B = uma única batelada, 2B = duas bateladas sem pré-tratamento, 2BP = duas bateladas com pré-tratamento, 1B-SE = uma única batelada sem etanol, 2BP-SE = duas bateladas com pré-tratamento, sem etanol. (S<sub>4</sub> e S<sub>5</sub>= sobrenadantes obtidos após a recuperação de P<sub>1</sub> e P<sub>3</sub>, respectivamente)**

Processo	Etapa do processo	Concentração de CDs						Volume medido (L)	CDs em cada etapa do processo (g)			CDs em todas as etapas do processo <sup>a</sup> (g)			Total de CDs em cada processo (g)	Rbu <sup>b</sup> (%)	Ra <sup>c</sup> (%)
		(mmol L <sup>-1</sup> )			(g L <sup>-1</sup> )				α	β	γ	α	β	γ			
		α	β	γ	α	β	γ										
1B	S <sub>1</sub>	35,27	20,46	4,45	34,29	23,22	5,77	0,073	2,49	1,68	0,42	2,88	2,14	0,50	5,52		36,80
	S <sub>4</sub>	4,79	4,80	2,39	4,66	5,45	3,10	0,084	0,39	0,46	0,07						
2B	S <sub>1</sub>	35,46	20,93	4,47	34,47	23,75	5,79	0,073	2,52	1,73	0,42	4,13	3,08	0,86	8,07	46,20	28,17
	S <sub>2</sub>	27,73	16,12	3,38	26,96	18,29	4,39	0,074	1,99	1,35	0,32						
	S <sub>3</sub>	26,77	14,65	4,90	26,02	16,63	6,35	0,054	1,41	0,90	0,34						
	S <sub>4</sub>	2,32	5,43	0,55	2,26	6,17	0,72	0,087	0,20	0,54	0,06						
	S <sub>5</sub>	7,97	3,78	1,59	7,75	4,29	2,06	0,068	0,53	0,29	0,14						
2BP	S <sub>1</sub>	35,08	19,99	4,43	34,10	22,69	5,74	0,072	2,45	1,63	0,41	4,63	3,14	0,92	8,69	57,43	28,97
	S <sub>2</sub>	21,04	12,63	3,55	20,45	14,33	4,60	0,059	1,21	0,85	0,27						
	S <sub>3</sub>	36,50	21,16	5,37	35,48	24,02	6,96	0,060	2,13	1,44	0,42						
	S <sub>4</sub>	7,25	4,16	0,89	7,05	4,72	1,15	0,081	0,57	0,38	0,09						
	S <sub>5</sub>	10,13	5,67	1,48	9,85	6,44	1,92	0,073	0,72	0,47	0,14						
1B-SE	S <sub>1</sub>	10,92	16,18	3,99	10,61	18,36	5,18	0,077	0,82	1,41	0,40	0,96	1,64	0,46	3,06		20,40
	S <sub>4</sub>	1,86	2,72	0,56	1,81	3,09	0,72	0,080	0,14	0,23	0,06						
2BP-SE	S <sub>1</sub>	10,92	16,18	3,99	10,61	18,36	5,18	0,077	0,82	1,41	0,40	1,34	2,19	0,63	4,16	35,95	13,87
	S <sub>2</sub>	6,86	11,42	2,70	6,67	12,96	3,50	0,067	0,45	0,87	0,23						
	S <sub>3</sub>	11,70	14,53	4,14	11,37	16,50	5,37	0,060	0,68	0,99	0,32						
	S <sub>4</sub>	1,86	2,72	0,56	1,81	3,09	0,72	0,080	0,14	0,23	0,06						
	S <sub>5</sub>	0,93	1,12	0,21	0,91	1,27	0,28	0,076	0,07	0,10	0,02						

<sup>a</sup> Igual a (S<sub>1</sub>+S<sub>4</sub>) para uma batelada e (S<sub>2</sub>+S<sub>3</sub>+S<sub>4</sub>+S<sub>5</sub>) para duas bateladas sequenciadas

<sup>b</sup> Aumento na produção de CDs pelo processo com duas bateladas sequenciadas em relação ao processo com uma batelada

<sup>c</sup> Rendimento de CDs produzidas em relação ao amido de milho utilizado

**Tabela 4.5 – Produção de CDs com amido de mandioca 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, pelos processos: 1B = uma única batelada, 2B = duas bateladas sem pré-tratamento, 2BP = duas bateladas com pré-tratamento, 1B-SE = uma única batelada sem etanol, 2BP-SE = duas bateladas com pré-tratamento, sem etanol.**

Processo	Etapa do processo	Concentração de CDs						Volume medido (L)	CDs em cada etapa do processo (g)			CDs em todas as etapas do processo <sup>a</sup> (g)			Total de CDs em cada processo (g)	Rbu <sup>b</sup> (%)	Ra <sup>c</sup> (%)
		(mmol L <sup>-1</sup> )			(g L <sup>-1</sup> )				α	β	γ	α	β	γ			
		α	β	γ	α	β	γ										
1B	S <sub>1</sub>	46,19	25,02	4,75	44,90	28,39	6,17	0,095	4,27	2,70	0,59	4,27	2,70	0,59	7,56		50,40
2B	S <sub>1</sub>	47,23	24,80	4,18	45,91	28,15	5,43	0,094	4,32	2,65	0,51						
	S <sub>2</sub>	48,20	22,90	2,97	46,85	25,99	3,85	0,082	3,84	2,13	0,32	6,29	3,29	0,80	10,38	38,82	34,60
	S <sub>3</sub>	28,06	11,39	4,12	27,28	12,93	5,34	0,090	2,45	1,16	0,48						
2BP	S <sub>1</sub>	45,15	25,23	5,32	43,89	28,63	6,90	0,096	4,21	2,75	0,66						
	S <sub>2</sub>	32,87	18,66	0,28	31,95	21,18	0,36	0,089	3,18	1,98	0,03	6,16	4,09	0,70	10,95	43,70	36,50
	S <sub>3</sub>	30,13	19,63	4,57	29,28	22,28	5,93	0,087	2,98	2,11	0,67						
1B-SE	S <sub>1</sub>	19,46	23,69	4,19	18,92	26,88	5,43	0,097	1,84	2,61	0,53	1,84	2,61	0,53	4,98		33,20
2BP-SE	S <sub>1</sub>	19,46	23,69	4,19	18,92	26,88	5,43	0,097	1,84	2,61	0,53						
	S <sub>2</sub>	14,40	20,52	3,47	14,00	23,29	4,50	0,090	1,26	2,10	0,40	2,90	3,92	0,88	7,70	54,62	25,70
	S <sub>3</sub>	20,59	20,76	4,76	20,02	23,56	6,17	0,091	1,82	2,14	0,56						

<sup>a</sup> Igual a S<sub>1</sub> para uma batelada e (S<sub>2</sub>+S<sub>3</sub>) para duas bateladas sequenciadas

<sup>b</sup> Aumento na produção de CDs pelo processo com duas bateladas sequenciadas em relação ao processo com uma batelada

<sup>c</sup> Rendimento de CDs produzidas em relação ao amido de milho utilizado

No processo com duas bateladas utiliza-se o dobro do amido que se emprega no processo com batelada única. Assim, na presença de 10 % (v/v) de etanol, o rendimento em CDs produzidas com relação ao amido de milho para os dois processos (com e sem pré-tratamento), foi em média de 37 % para o processo de uma única batelada e de 28 % para o de duas bateladas sequenciadas, enquanto para o amido de mandioca foi em média de 50 % para o processo de uma única batelada e de 36 % para o de duas bateladas sequenciadas. Como o amido tem baixo custo em relação ao preço das CDs e da enzima, o processo com duas bateladas sequenciadas mostrou-se vantajoso em relação ao de uma batelada, com maior rendimento para o processo com pré-tratamento do amido para a segunda batelada, na presença de 10 % de etanol (v/v).

#### 4.6 PRODUÇÃO DE CDS EM BATELADAS SEQUENCIADAS COM POSTERIOR SEPARAÇÃO DA $\beta$ -CD POR CRISTALIZAÇÃO

Nas Tabelas 4.6 e 4.7 e Figura 4.18 são apresentados os resultados das análises por CLAE, dos ensaios realizados conforme metodologia descrita no item 3.2.10, para o amido de milho e o de mandioca. Observa-se que em todos os processos, a concentração de  $\beta$ -CD cristalizada e precipitada foi maior quando se empregou o amido de mandioca. Para o processo de duas bateladas com amido pré-tratado para a segunda batelada (2BP) obteve-se 1,55 g de  $\beta$ -CD em 5,40 g de precipitado (28,7 % de pureza) para o amido de milho, enquanto para o amido de mandioca obteve-se 2,29 g de  $\beta$ -CD em 4,30 g de precipitado (53,3 % de pureza).

Embora o procedimento de cristalização e precipitação tenha sido padronizado para todos os ensaios, não houve uma coerência quanto à quantidade de amido não convertido (ANC) presente nos precipitados obtidos: para o amido de milho, foi maior no processo de duas bateladas (2B), enquanto para o amido de mandioca foi para o processo de duas bateladas com amido pré-tratado, na ausência de etanol (2BP-SE). Para esses dois precipitados utilizou-se a técnica da purificação por recristalização, descrita no item 3.2.11.2, com resultados apresentados no item 4.7.2.

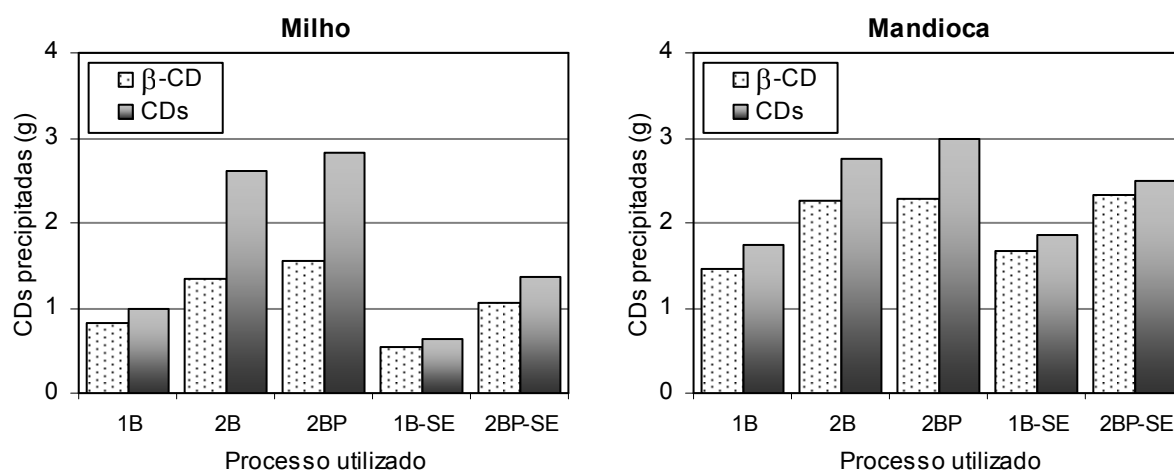
**Tabela 4.6 – Composição dos precipitados (Pp) contendo as CDs produzidas e cristalizadas a partir do amido de milho, analisados por CLAE. ANC = amido não convertido em CDs,  $CDs = (\alpha\text{-CD} + \beta\text{-CD} + \gamma\text{-CD})$ , RaCDs = rendimento de CDs produzidas em relação ao amido utilizado, Ra $\beta$  = rendimento de  $\beta$ -CD produzida em relação ao amido utilizado.**

Processo Utilizado	Pp (g)	Composição do Pp (g)				CDs (g)	Pureza da $\beta$ -CD (%)	Rendimentos (%)	
		ANC	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD			RaCDs	Ra $\beta$
1B	1,40	0,40	0,17	0,83	0,00	1,00	59,3	6,68	5,55
2B	6,40	3,78	1,13	1,35	0,14	2,62	21,1	8,72	4,51
2BP	5,40	2,57	1,05	1,55	0,22	2,83	28,7	9,42	5,17
1B-SE	0,90	0,25	0,11	0,53	0,00	0,65	58,9	4,31	3,56
2BP-SE	2,00	0,65	0,24	1,07	0,05	1,35	53,5	4,51	3,56

**Tabela 4.7 – Composição dos precipitados (Pp) contendo as CDs produzidas e cristalizadas a partir do amido de mandioca, analisados por CLAE. ANC = amido não convertido em CDs,  $CDs = (\alpha\text{-CD} + \beta\text{-CD})$ , RaCDs = rendimento de CDs produzidas em relação ao amido utilizado, Ra $\beta$  = rendimento de  $\beta$ -CD produzida em relação ao amido utilizado.**

Processo Utilizado	Pp (g)	Composição do Pp (g)			CDs (g)	Pureza da $\beta$ -CD (%)	Rendimentos (%)	
		ANC	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD			RaCDs	Ra $\beta$
1B	2,20	0,47	0,26	1,47	1,73	66,8	11,53	9,80
2B	3,74	0,99	0,50	2,25	2,75	60,2	9,17	7,50
2BP	4,30	1,31	0,70	2,29	2,99	53,3	9,97	7,63
1B-SE	2,70	0,84	0,19	1,67	1,86	61,9	12,40	11,13
2BP-SE	11,50	9,00	0,17	2,33	2,50	20,3	8,33	7,77

A metodologia de cristalização e precipitação da  $\beta$ -CD não foi completamente eficaz, pois nos processos empregados, cerca de 50 % do que foi produzido não foi separado e em todos os processos houve precipitação também de  $\alpha$ -CD e ANC, em alguns casos também traços de  $\gamma$ -CD.



**Figura 4.18 – Produção de CDs, com posterior precipitação por cristalização, com amido de milho ou mandioca 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, pelos processos: 1B = uma única batelada, 2B = duas bateladas sem pré-tratamento, 2BP = duas bateladas com pré-tratamento, 1B-SE = uma única batelada sem etanol, 2BP-SE = duas bateladas com pré-tratamento, sem etanol.**

#### 4.7 RECRISTALIZAÇÃO DA $\beta$ -CD

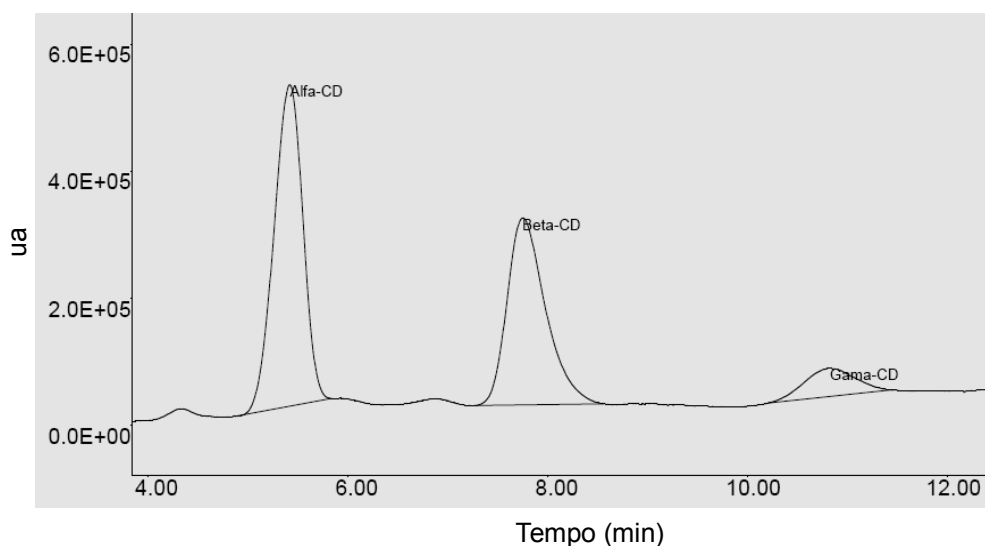
Os precipitados obtidos com a cristalização e recristalização foram analisados por CLAE. Os cromatogramas que serão apresentados nas Figuras 4.19 a 4.28 possuem, eventualmente, tempos de retenção das CDs diferenciados pois, além de terem sido utilizados dois cromatógrafos diferentes (Gilson ou Varian), com ou sem injeção automática, também foi necessária a troca da coluna. No entanto, isso não interferiu na precisão dos resultados, uma vez que em todas as ocasiões em que foi necessária uma troca das condições de análise, construiu-se uma nova curva padrão.

##### 4.7.1 Ensaios com recristalizações sucessivas a partir de um processo de produção de CDs com batelada única

Nesta seção, são apresentados os resultados do experimento descrito no item 3.2.11.1. Na Figura 4.19, apresenta-se o cromatograma obtido de uma amostra do sobrenadante  $S_1$ , contendo as CDs produzidas, que foi depois, submetido à cristalização que deu origem ao precipitado  $Pc_1$ . Com as áreas do cromatograma, aplicadas à curva padrão de cada CD e levando-se em conta a diluição da amostra e o volume total medido de  $S_1$  que foi de 365 mL,



obteve-se a composição em CDs que foi de  $\alpha$ -CD = 11,77 g,  $\beta$ -CD = 9,64 g e  $\gamma$ -CD = 2,20 g.



**Figura 4.19 – Cromatograma do sobrenadante  $S_1$  antes da cristalização, diluído 40 vezes para a análise por CLAE.**

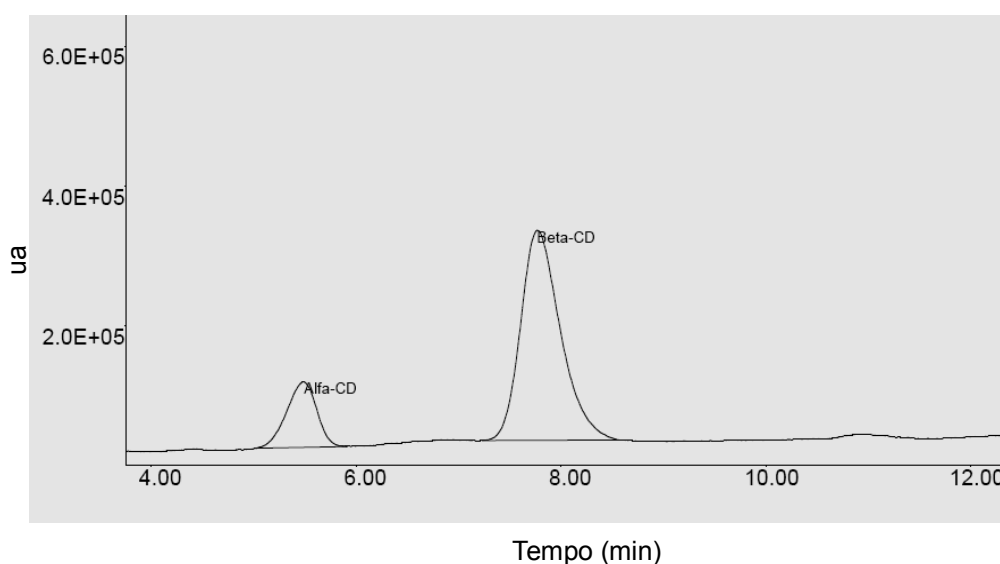
Na Tabela 4.8 e Figuras 4-20 a 4-24 são apresentados os resultados obtidos com a cristalização a partir de  $S_1$ ; recristalização a partir da solução obtida com a ressuspensão do precipitado  $Pc_1$ ; duas cristalizações sucessivas a partir do sobrenadante resultante da recristalização; e cristalização a partir de  $S_a$  (sobrenadante resultante da primeira cristalização), conforme metodologia apresentada na Figura 3.5.

**Tabela 4.8 – Composição dos precipitados obtidos contendo as CDs produzidas e cristalizadas a partir do amido de milho 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, volume de reação de 500 mL. Análises por CLAE. ANC = amido não convertido em CDs.**

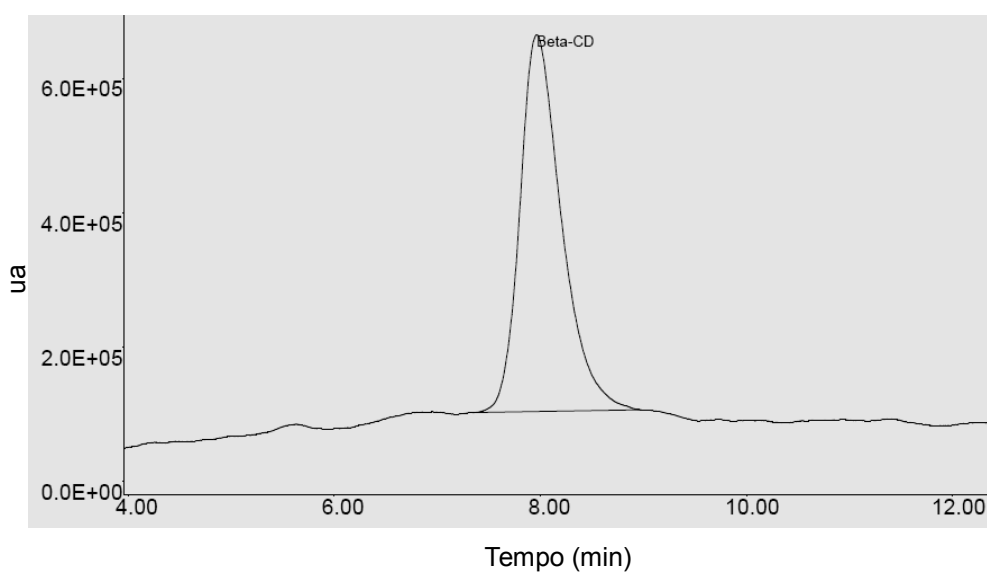
Processo	Figura	Precipitado obtido (g)	Composição do precipitado (g)			Pureza da $\beta$ -CD (%)
			$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	ANC	
Cristalização	4.20	( $Pc_1$ ) 9,62	1,61	7,65	0,36	79,5
Recristalização	4.21	( $Prc_1$ ) 2,50	0,00	2,38	0,12	95,0
1ª Cristalização	4.22	( $Prc_2$ ) 1,50	0,11	1,26	0,13	83,7
2ª Cristalização	4.23	( $Prc_3$ ) 1,03	0,20	0,58	0,25	56,1
Cristalização do S	4.24	( $Pc_2$ ) 2,88	0,62	0,72	1,54	25,1

O objetivo da recristalização é a obtenção da  $\beta$ -CD pura. Observa-se que com a recristalização, houve um aumento no grau de pureza de 79,5 %, que foi o obtido com a cristalização, para 95,0 %. Apesar do aumento da pureza na recristalização, houve redução da

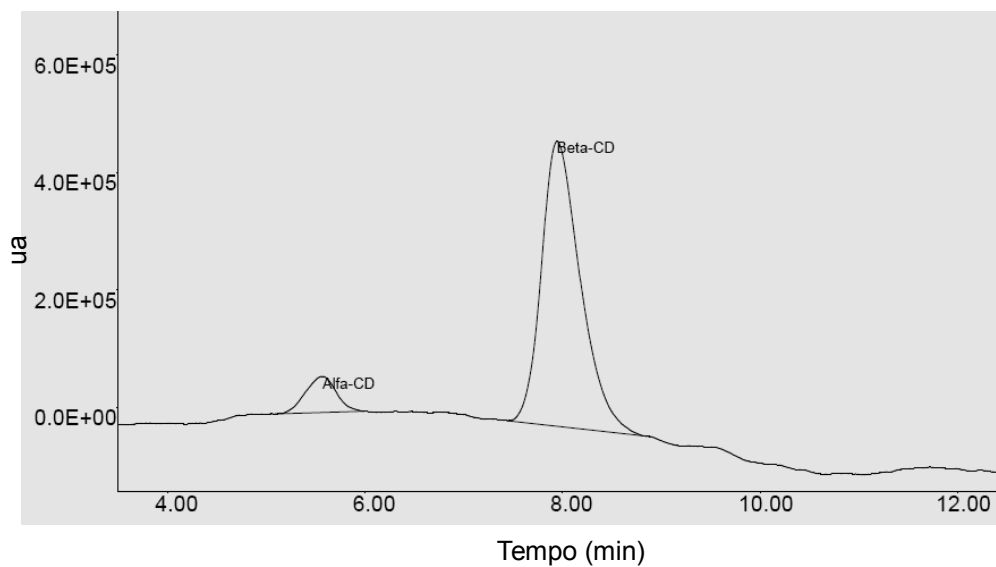
massa de precipitado obtido de 9,62 g para 2,50 g. Com as duas cristalizações a partir do sobrenadante da recristalização (Figuras 4.22 e 4.23), à medida que se concentraram os sobrenadantes, houve aumento da massa de  $\alpha$ -CD e amido não convertido (ANC) no precipitado, o mesmo ocorrendo na cristalização das CDs contidas em S (Figura 4.24), uma vez que a maior parte da  $\beta$ -CD havia sido precipitada no  $Pc_1$ .



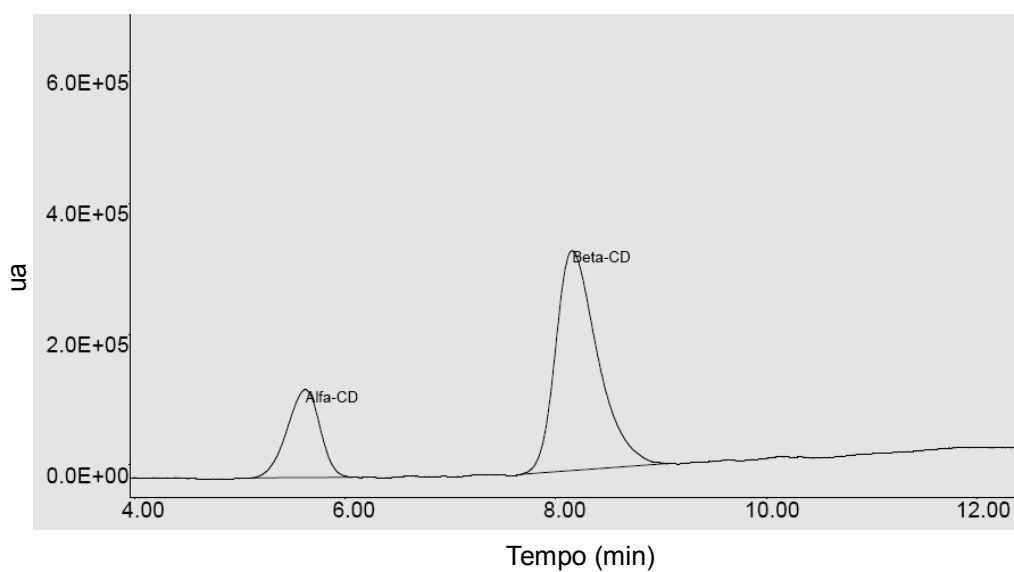
**Figura 4.20** – Cromatograma do precipitado ( $Pc_1$ ) obtido com a cristalização das CDs presentes em  $S_1$ . Amostra para análise por CLAE: 0,1 g/500 mL.



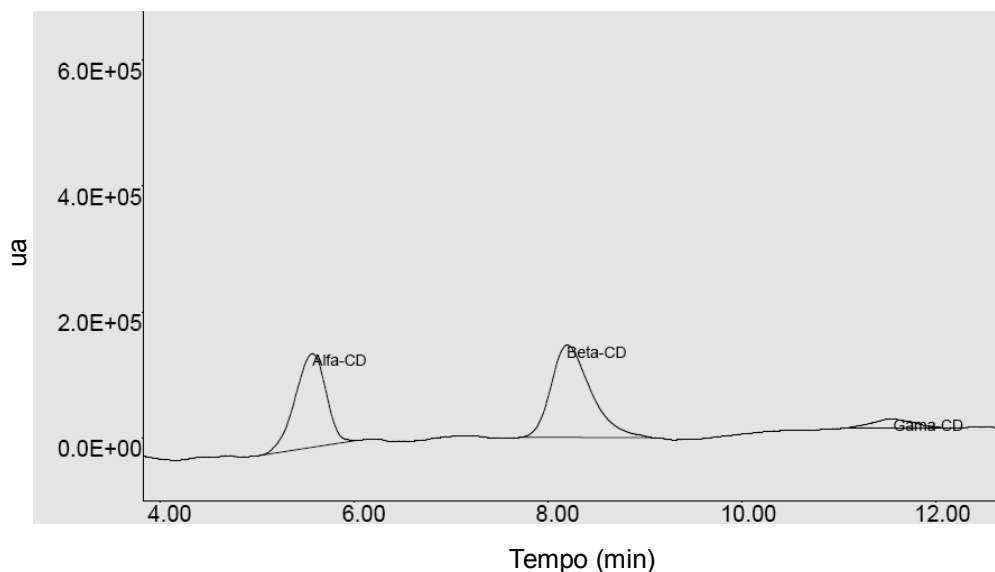
**Figura 4.21** – Cromatograma do precipitado ( $Prc_1$ ) obtido com a recristalização das CDs a partir do precipitado  $Pc_1$  ressuspenso. Amostra para análise por CLAE: 0,1 g/100 mL.



**Figura 4.22** – Cromatograma do precipitado (Prc<sub>2</sub>) obtido com a cristalização das CDs a partir do sobrenadante Sb. Amostra para análise por CLAE: 0,1 g/100 mL.



**Figura 4.23** – Cromatograma do precipitado (Prc<sub>3</sub>) obtido com a cristalização das CDs, a partir do sobrenadante Sc. Amostra para análise por CLAE: 0,1 g/100 mL.



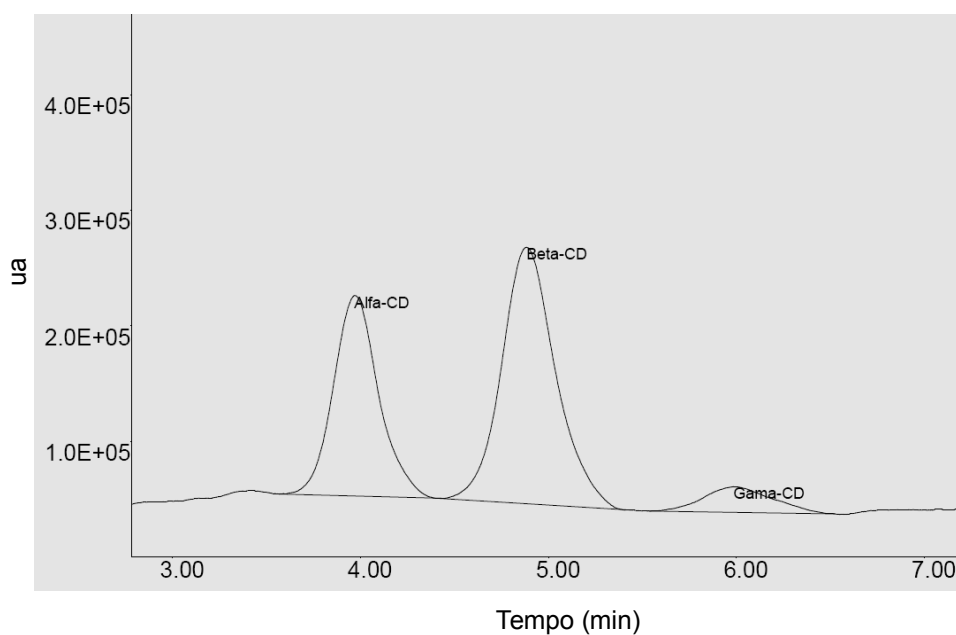
**Figura 4.24 – Cromatograma do precipitado ( $Pc_2$ ) obtido com a cristalização de Sa (sobrenadante resultante da primeira cristalização a partir de  $S_1$ ). Amostra para análise: 0,1 g/100 mL.**

#### **4.7.2 Ensaios com recristalizações de precipitados produzidos a partir de processos com bateladas sequenciadas**

Na Tabela 4.9 e Figuras 4-25 a 4-28 são apresentados os resultados obtidos na recristalização a partir da ressuspensão dos precipitados obtidos nos processos 2BP para o amido de milho e 2BP-SE para o amido de mandioca. O procedimento foi descrito no item 3.2.11.2. Esses dois precipitados continham uma grande massa de amido não convertido e após o processo de recristalização, o precipitado proveniente do processo com amido de milho, teve um aumento no grau de pureza da  $\beta$ -CD de 28,7 % para 86,3 %, enquanto para o processo com amido de mandioca o aumento foi de 20,3 % para 95,0 %. Embora as massas obtidas após as recristalizações sejam significativamente menores, esse processo apresenta-se como uma alternativa para a purificação do precipitado obtido com a cristalização das CDs, principalmente nos processos de bateladas sequenciadas onde se observou uma tendência maior da precipitação de amido não convertido.

**Tabela 4.9 – Composição dos precipitados (Pp) obtidos contendo as CDs produzidas em bateladas sequenciadas, cristalizadas e recristalizadas, a partir do amido de milho ou de mandioca 15 % (m/v), a 65 °C, pH 6, volume de reação de 100 mL. Análises por CLAE. ANC = amido não convertido em CDs.**

Amido	Processo de produção das CDs	Processo de separação das CDs	Figura	Pp obtido (g)	Composição (g)				β-CD (%)
					α-CD	β-CD	γ-CD	ANC	
milho	2BP	Em solução			4,63	3,14	0,92		
		Cristalização	4.26	5,40	1,05	1,55	0,22	2,58	28,7
		Recristalização	4.27	0,80	0,06	0,69		0,05	86,3
mandioca	2BP-SE	Em solução			2,90	3,92	0,88		
		Cristalização	4.28	11,50	0,17	2,33		9,00	20,3
		Recristalização	4.29	1,20	0,05	1,14		0,01	95,0



**Figura 4.25 – Cromatograma do precipitado (Pp) obtido com a cristalização das CDs presentes em (S<sub>2</sub>+S<sub>3</sub>+S<sub>4</sub>+S<sub>5</sub>), produzidas com amido de milho. Amostra para análise por CLAE: 0,1 g/100 mL.**

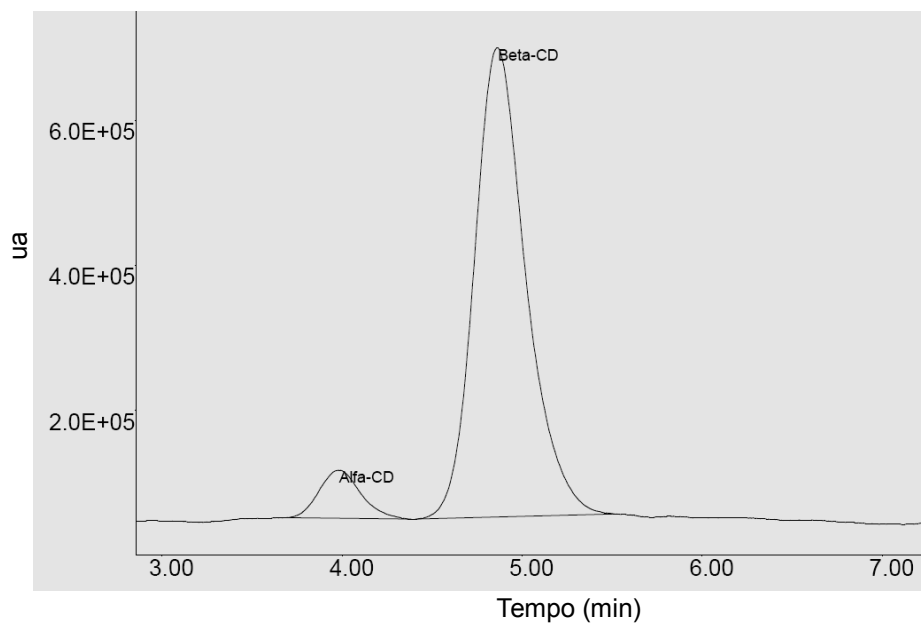


Figura 4.26 – Cromatograma do precipitado obtido com a recrystalização das CDs a partir do precipitado (ressuspensão), apresentado na Figura 4.25, produzidas com amido de milho. Amostra para análise por CLAE: 0,1 g/100 mL.

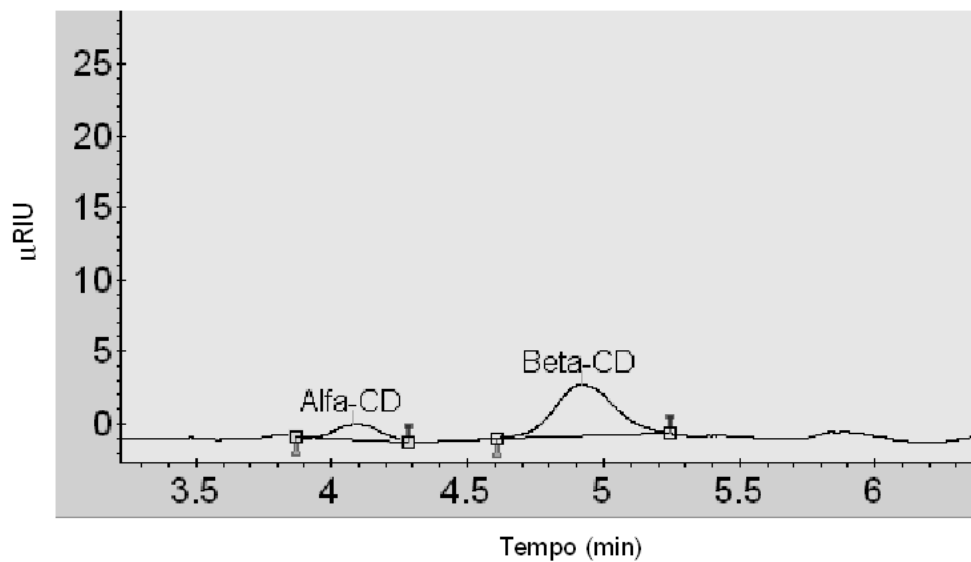
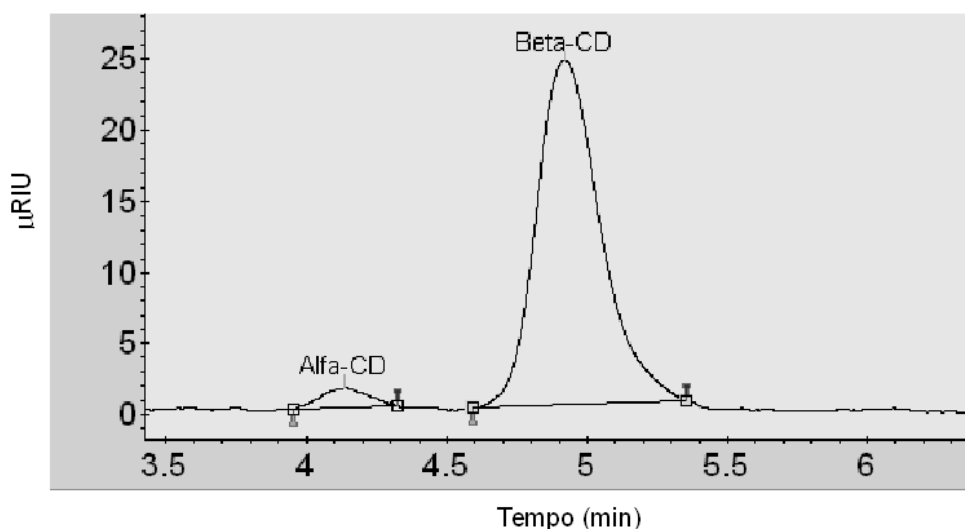


Figura 4.27 – Cromatograma do precipitado (Pp) obtido com a cristalização das CDs presentes em (S<sub>2</sub>+S<sub>3</sub>), produzidas com amido de mandioca. Amostra para análise por CLAE: 0,2 g/100 mL.



**Figura 4.28** – Cromatograma do precipitado obtido com a recristalização das CDs a partir do precipitado (ressuspenso), apresentado na Figura 4.27, produzidas com amido de mandioca. Amostra para análise por CLAE: 0,5 g/100 mL.

Com a realização dos ensaios apresentados na Parte 1, pode-se observar que os experimentos em que se utilizaram duas bateladas sequenciadas com pré-tratamento dos grânulos de amido, foram os que apresentaram maiores rendimentos e que a presença do etanol (10 % (v/v)), foi vantajosa em todos os processos. O amido de mandioca apresentou maiores rendimentos em relação ao amido de milho. Observou-se ainda, que o processo de cristalização e recristalização apresentou-se como uma boa alternativa para a separação e purificação da  $\beta$ -CD, embora parâmetros como concentração da solução, agitação, temperatura e tempo de cristalização deverão ser otimizados em trabalhos futuros.

## 5 CONCLUSÕES

Para a concentração de amido 15 % (m/v), nas condições de reação de 65 °C e pH 6, é mais viável trabalhar com 0,1 % (v/v) da enzima Toruzyme®, 10 % (v/v) de etanol, com tempo de reação de 12 horas.

A presença de etanol no meio reacional, na concentração de 10 % (v/v), aumentou a produção de  $\beta$ -CD em torno de 18 % com o amido de milho e 21 % com o de mandioca e praticamente triplicou a produção de  $\alpha$ -CD. Para a  $\gamma$ -CD, independente da concentração de etanol empregada e do substrato, a produção foi muito baixa (em torno de 4 mmol L<sup>-1</sup>). Em relação ao processo sem etanol, a produção total de CDs foi aproximadamente 70 % maior com o amido de milho e 80 % com o amido de mandioca, com a utilização de 10 % (v/v) de etanol.

O comportamento da enzima mudou de  $\alpha\beta$ - para  $\alpha$ -CGTase, com a adição de 10 % (v/v) de etanol ao meio de reação.

O método colorimétrico da fenolftaleína utilizado na determinação da  $\beta$ -CD produziu resultados aproximados aos obtidos com a cromatografia líquida, tendo sido observadas variações de 1 a 15 %.

Nas condições de reação empregadas (amido de milho 15 % (m/v), 65 °C, pH 6, 10 % (v/v) de etanol), a atividade específica por massa de proteína determinada para a enzima Toruzyme® foi de 65,49 U mg<sup>-1</sup>, considerando-se o total de CDs produzidas. O teor de proteína da enzima, determinado pelo método de Bradford, foi de 5,65 g L<sup>-1</sup>.

Na separação da  $\beta$ -CD por cristalização, as etapas de adição da enzima amiloglicosidase e das sementes de cristalização ( $\beta$ -CD pura) não resultaram em aumento da pureza ou do rendimento em  $\beta$ -CD precipitada. A etapa de adição do carvão ativado propiciou a formação de um precipitado mais branco, aparentemente mais puro do que no processo em que não se utilizou o carvão.

O emprego de duas bateladas sequenciadas, na presença de 10 % (v/v) de etanol, com pré-tratamento do amido para a segunda batelada (2BP), foi o processo que apresentou maior rendimento, produzindo 8,95 g de CDs com o amido de milho e 10,95 g com o amido de mandioca. Em relação ao processo com uma única batelada (1B), o aumento na produção de CDs foi de 57,43 % com o amido de milho e de 43,70 % com o de mandioca, com a mesma



carga enzimática. Em relação ao processo com batelada única sem etanol (1B-SE), a produção de CDs aumentou em 184% com o amido de milho e em 120% com o de mandioca.

Nos processos com duas bateladas sequenciadas a influência do etanol foi maior para o amido de milho, causando um aumento de aproximadamente 100 % na produção em relação ao processo sem etanol, enquanto para o amido de mandioca o aumento foi de 42 %.

Nos processos avaliados, a produção de CDs com o amido de mandioca como substrato foi em média 30 % maior do que com o amido de milho.

A metodologia de cristalização e precipitação da  $\beta$ -CD empregada não foi completamente eficaz uma vez que, nos processos utilizados, cerca de 50 % do que foi produzido não foi separado e em todos os processos houve precipitação também de  $\alpha$ -CD, de amido não convertido e em alguns casos, de traços de  $\gamma$ -CD.

Nos experimentos de recristalização, foi possível elevar o grau de pureza da  $\beta$ -CD de um precipitado produzido a partir de um processo em que se utilizou amido de milho como substrato, de 28,7 % para 86,3 %, e de um processo em que se empregou amido de mandioca, de 20,3 % para 95,0 %, comprovando-se que a recristalização representa uma boa alternativa para a purificação dos precipitados contendo  $\beta$ -CD.

Parâmetros como concentração da solução, agitação, temperatura e tempo de cristalização, deverão ser otimizados em trabalhos futuros, o mesmo podendo se feito para o processo de recristalização da  $\beta$ -CD.

## **PARTE 2**

### **FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO CICLODEXTRINA/ENROFLOXACINA**

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais e os principais métodos empregados no desenvolvimento dos ensaios de avaliação da formação de complexo de inclusão ciclodextrina/enrofloxacina (CD/FLOX).

### 6.1 MATERIAIS

#### 6.1.1 Reagentes

Os principais reagentes empregados no trabalho foram:

- Enrofloxacina (FLOX), cedida pela Formil Química Ltda (Barueri - SP).
- Beta-ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), adquiridas da Sigma Chemical Co. (EUA); alfa-ciclodextrina ( $\alpha$ -CD) da Fluka Chemie AG (Suécia) e gama-ciclodextrina ( $\gamma$ -CD) cedida pela Wacker Consortium (Alemanha) e Cyclolab (Hungria).
- Membrana em ester de celulose 0,22  $\mu$ m, 47 mm de diâmetro, marca Millipore.
- Os demais reagentes foram de grau analítico.

#### 6.1.2 Equipamentos

- Espectrofotômetro UV-1601-PC – Shimadzu
- Agitador orbital termostatizado – Tecnal TE-422
- Medidor de pH DMPH-1 – Digimed
- Aparelhagem para filtração a vácuo
- Balança analítica BEL
- Análises térmicas DSC e TGA: aparelho STA NETZCH 409 PC / PG

## 6.2 MÉTODOS

### 6.2.1 Solubilidade da enrofloxacin pura

(a) Inicialmente foi preparada uma solução aquosa de baixa concentração ( $0,02 \text{ g L}^{-1}$ ) e foram comparados os espectros de absorção da solução antes e depois de uma filtração em membrana de  $0,22 \mu\text{m}$ , a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , visando verificar se todo o material estava dissolvido e determinar a absorção no pico de máximo do espectro, possibilitando obter a partir deste dado a correlação da absorção com a concentração (Lei de Beer), usada para calcular a concentração das soluções de FLOX nos testes subsequentes (Equação 6.1). As varreduras foram efetuadas em espectrofotômetro na faixa de 190 a 1100 nm.

$$C_F = \frac{A D}{\epsilon L} \quad (6.1)$$

Onde:

$C_F$  = Concentração de FLOX ( $\text{mol L}^{-1}$ )

A = Absorvância da amostra a 272 nm

D = Diluição da amostra

$\epsilon$  = Absortividade molar da FLOX (unidades de absorção  $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

L = Distância que a luz percorre na cubeta contendo a solução (cm)

(b) Foi determinada então, a solubilidade da FLOX pura a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  com o seguinte procedimento:

- Preparou-se uma solução de FLOX em água destilada utilizando-se excesso do produto ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ).
- Esta solução foi agitada por 5 dias a 150 rpm e  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo filtrada em seguida com membrana de  $0,22 \mu\text{m}$ .
- Após diluição, o sobrenadante foi lido a 272 nm no espectrofotômetro.
- Com a leitura da absorvância, aplicada na Equação 7.1 apresentada na seção 7.1, calculou-se a solubilidade da FLOX a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 7.

### 6.2.2 Verificação da linearidade da análise espectrofotométrica para a enrofloxacina

Este ensaio foi realizado com o objetivo de se comprovar a aplicabilidade da Lei de Beer, ou seja, a linearidade entre a absorvância medida em função da concentração de uma solução de FLOX, e o limite de concentração para a validade de aplicação desta relação. O teste foi realizado de acordo com o seguinte protocolo:

- Foram pesados 0,0100 gramas de FLOX e dissolvidos em 100 mL de água destilada.
- A solução ficou sob agitação a 30 °C por 2 horas para facilitar a dissolução.
- Filtrou-se a solução em membrana Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ , diluindo-a em seguida para: 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:7, 1:10 e 1:20 com água destilada.
- Efetuou-se a leitura da absorvância das soluções diluídas, a 272 nm.

### 6.2.3 Influência da $\beta$ -CD sobre o espectro de absorvância de uma solução de enrofloxacina

A finalidade deste ensaio foi determinar a influência da  $\beta$ -CD sobre o espectro de absorção da FLOX, de forma a verificar a validade do emprego da Equação 6.1, quando da determinação da concentração de FLOX, na presença da  $\beta$ -CD. Se fosse observada alteração na absorção molar específica da FLOX pela formação do complexo de inclusão da FLOX em  $\beta$ -CD, então isto deveria ser levado em conta nos testes subsequentes.

O procedimento experimental deste item consistiu nas seguintes etapas:

- Foi preparada uma solução de 0,004 g de FLOX/100 mL de água (Solução 1) e uma solução de 1,8 g de  $\beta$ -CD/100 mL de água (Solução 2).
- Onze tubos de ensaio foram preparados usando-se uma mistura de 2 mL da Solução 1 e de 0 a 2 mL da Solução 2, sendo o volume da mistura completado para 4 mL com água destilada. Desta forma as soluções ficaram com uma concentração constante de FLOX, de 0,02 g L<sup>-1</sup>, enquanto a concentração de  $\beta$ -CD variou de 0 a 9 g L<sup>-1</sup>, como pode ser observado na Tabela 6.1.
- As amostras foram agitadas em equipamento tipo vórtice e as varreduras efetuadas em espectrofotômetro.

- As amostras foram guardadas em geladeira e submetidas a novas varreduras após três dias para verificação de alguma alteração na concentração da solução.

**Tabela 6.1 – Soluções utilizadas para a medida da influência da  $\beta$ -CD sobre o espectro de absorção da FLOX (Solução 1: 0,004 g de FLOX/100 mL de água e Solução 2: 1,8 g de  $\beta$ -CD/100 mL de água).**

Amostra	Solução 1 (mL)	Solução 2 (mL)	Água destilada (mL)	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	
				de FLOX	de $\beta$ -CD
1	2,0	0,0	2,0	0,02	0,0
2	2,0	0,2	1,8	0,02	0,9
3	2,0	0,4	1,6	0,02	1,8
4	2,0	0,6	1,4	0,02	2,7
5	2,0	0,8	1,2	0,02	3,6
6	2,0	1,0	1,0	0,02	4,5
7	2,0	1,2	0,8	0,02	5,4
8	2,0	1,4	0,6	0,02	6,3
9	2,0	1,6	0,4	0,02	7,2
10	2,0	1,8	0,2	0,02	8,1
11	2,0	2,0	0,0	0,02	9,0
12	0,0	2,0	2,0	0,00	9,0

#### 6.2.4 Solubilidade da enrofloxacin na presença de ciclodextrinas

Neste teste utilizou-se os diagramas de solubilidade (concentração da FLOX em função da concentração de ciclodextrina) para a obtenção de informações sobre a formação de complexos de inclusão, assim como da proporção hóspede/hospedeiro do complexo formado.

As medidas de solubilidade foram conduzidas de acordo com o método de Higuchi e Connors (1965), seguindo o procedimento descrito a seguir:

- As soluções das ciclodextrinas em estudo foram preparadas nas concentrações iniciais próximas ao limite de suas solubilidades, de acordo com a Tabela 6.2.
- Diluiu-se cada uma dessas soluções de ciclodextrina em pelo menos cinco diferentes concentrações, num volume total de 10 mL e adicionou-se em frascos contendo, cada

um, 0,1000 g de FLOX. Para evitar contaminação microbiana, utilizou-se azida sódica nas suspensões, na concentração de 0,01 % (m/v).

- Após homogeneizadas, por agitação manual suave dos frascos, as suspensões foram colocadas sob agitação de 150 rpm, a 30 °C, durante 3 dias.
- Decorrido esse tempo, cada amostra foi filtrada a vácuo em membrana Millipore (0,22 µm) e mediu-se o pH dos sobrenadantes, diluindo-os em seguida com água destilada para realizar a análise por espectrofotômetro (varreduras na região de 190 a 500 nm e absorvância a 272 nm).
- Com as leituras de absorvância a 272 nm aplicadas à Equação 7.1 calculou-se as concentrações de FLOX, e com estas, traçou-se o diagrama de solubilidade, ou seja, o gráfico de concentração de FLOX (mmol L<sup>-1</sup>) em função da concentração de ciclodextrina (mmol L<sup>-1</sup>).
- Se o diagrama de solubilidade tem a forma de uma reta, conclui-se de acordo com Higuchi e Connors (1965) que a proporção molar das substâncias que formam o complexo é 1:1 e calcula-se a constante de estabilidade do complexo formado (K) pela Equação 6.2 e o aumento da solubilidade (n) pela Equação 6.3, onde:

K = Constante de estabilidade do complexo formado

I = Inclinação da reta obtida

S<sub>0</sub> = Quantidade de FLOX que é solúvel na ausência da CD

n = Número de vezes que a solubilidade aumenta com a adição da CD

S<sub>max</sub> = Máxima concentração de FLOX obtida no filtrado após a adição da CD

$$K = \frac{I}{S_0(1-I)} \quad (6.2)$$

$$n = \frac{S_{\max}}{S_0} \quad (6.3)$$

Segundo Loftsson *et al.* (2007), um método para avaliar o potencial de solubilização das CDs é determinar a eficiência de complexação (EC) pela equação 6.4.

$$EC = S_0 K = \frac{I}{(1 - I)} \quad (6.4)$$

Na Tabela 6.2 apresenta-se as soluções de CDs usadas nos testes de solubilidade da FLOX na presença de CDs, com as máximas concentrações, que foram limitadas pela solubilidade das CDs.

**Tabela 6.2 – Soluções de ciclodextrinas utilizadas nos estudos de solubilidade da FLOX.**

Ciclodextrina (CD)	Concentração máxima de CD	
	(g L <sup>-1</sup> )	(mmol L <sup>-1</sup> )
α-CD	120,80	124,28
β-CD	18,00	15,86
γ-CD	207,50	160,00
HP-β-CD	263,10	180,21

### 6.2.5 Solubilidade da enrofloxacin na presença de ácido cítrico

O objetivo deste ensaio foi determinar a influência do ácido cítrico usado como coadjuvante da solubilização da FLOX, uma vez que ele altera o pH da solução e já foi visto que o pH altera a solubilidade da FLOX (Seção 1, INTRODUÇÃO). Este ácido também será empregado no item seguinte (Seção 6.2.6) como auxiliar de complexação da FLOX com a β-CD e, portanto, poderá ter um segundo efeito sobre a solubilidade da FLOX. A medida da influência isolada do ácido cítrico permite separar posteriormente a sua influência sobre a formação do complexo e quantificar o segundo efeito de solubilidade. O protocolo do teste é descrito a seguir:

- Em balões volumétricos de 10 mL, preparou-se soluções de ácido cítrico nas concentrações de 1, 2, 5, 10, 15, 20 e 50 mmol L<sup>-1</sup>, contendo 0,01 % (m/v) de azida sódica.
- Essas soluções foram adicionadas em frascos contendo, cada um, 0,1000 g de FLOX.
- Após a homogeneização das suspensões por agitação manual suave, os frascos foram colocados sob agitação de 150 rpm, a 30 °C, durante 5 dias.



- Decorrido esse tempo, cada amostra foi filtrada a vácuo em membrana Millipore (0,22  $\mu\text{m}$ ), e os sobrenadantes foram diluídos com água destilada para análise por espectrofotômetro com varreduras na região de 190 a 500 nm e determinação da absorvância a 272 nm.
- Aplicou-se o valor da absorvância medida a 272 nm na Equação 7.1 para obter-se a concentração de FLOX que foi solubilizada em função da concentração do ácido cítrico.
- Mediu-se também o pH das soluções filtradas de forma a obter-se a concentração da FLOX solubilizada em função do pH.

### 6.2.6 Solubilidade da enrofloxacin na presença de ácido cítrico e $\beta$ -CD

A finalidade deste teste foi verificar se o ácido cítrico aumenta a solubilidade da FLOX na presença de  $\beta$ -CD e seguiu-se os seguintes procedimentos:

- Solução 1: Preparou-se uma solução 5 mmol L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, contendo 0,01 % (m/v) de azida sódica.
- Solução 2: Preparou-se uma solução de  $\beta$ -CD na concentração de 1,8 g/100 mL de solução 1.
- De acordo com a concentração de  $\beta$ -CD desejada essas soluções foram adicionadas em frascos contendo 0,1000 g de FLOX, conforme a Tabela 6.3.
- Depois de homogeneizadas, essas soluções foram colocadas sob agitação de 150 rpm, a 30 °C, durante 5 dias.
- Decorrido esse tempo, cada amostra foi filtrada a vácuo em membrana Millipore (0,22  $\mu\text{m}$ ), e os sobrenadantes foram diluídos com água destilada para análise por espectrofotômetro (varreduras na região de 190 a 500 nm e absorvância a 272 nm).
- Mediu-se o pH das soluções filtradas.

**Tabela 6.3 – Soluções de  $\beta$ -CD contendo  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido cítrico e  $0,1000 \text{ g}$  de FLOX, utilizadas nos estudos de solubilidade da FLOX. Solução 1: ácido cítrico  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  contendo  $0,01 \%$  (m/v) de azida sódica. Solução 2:  $\beta$ -CD  $1,8 \text{ g /100 mL}$  de solução 1. Volume total de  $10 \text{ mL}$ .**

Amostra	Concentração de $\beta$ -CD ( $\text{g L}^{-1}$ )	Solução 1 (mL)	Solução 2 (mL)
1	0,0	10	0
2	1,8	9	1
3	3,6	8	2
4	5,4	7	3
5	7,2	6	4
6	9,0	5	5
7	10,8	4	6
8	12,6	3	7
9	14,4	2	8
10	16,2	1	9
11	18,0	0	10

### 6.2.7 Análises de DSC e TGA

Análises térmicas foram utilizadas para confirmar a complexação da enrofloxacinina com as CDs.

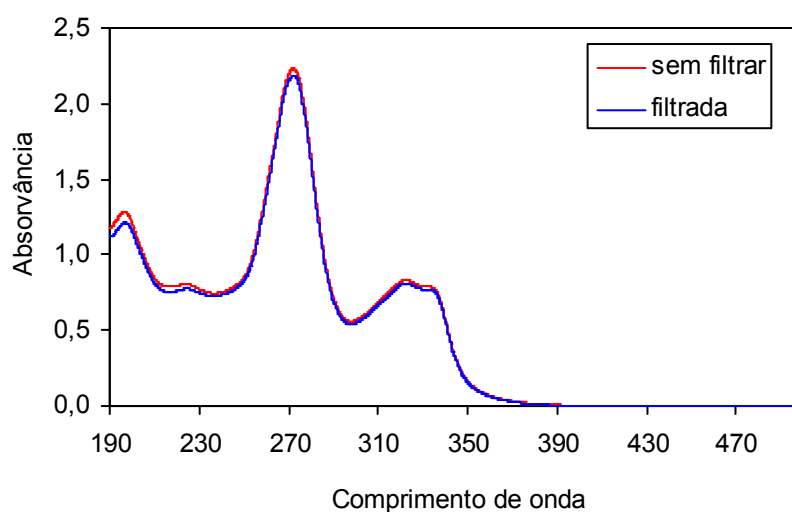
Para as análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e termogravimétrica (TGA) dos complexos enrofloxacinina/CDs, utilizou-se o equipamento STA NETZCH 409 PC / PG. Foram obtidas curvas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio ( $30 \text{ mL min}^{-1}$ ), a uma taxa de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  ( $20$  a  $500 \text{ }^\circ\text{C}$ ). As amostras para essas análises foram preparadas pela técnica de amassamento (kneading): os complexos da enrofloxacinina com cada CD, foram preparados na razão molar 1:1. Adicionou-se  $1 \text{ mL}$  de água a  $1 \text{ g}$  de CD à temperatura ambiente, amassando até atingir a homogeneização (cerca de  $5 \text{ min}$ ). A enrofloxacinina foi então adicionada à pasta e o amassamento continuou por um período adicional de  $20 \text{ min}$ . A pasta resultante foi seca em dessecador à temperatura ambiente ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) por  $48 \text{ h}$ .

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos na parte 2 do trabalho, são apresentados e analisados neste capítulo.

### 7.1 SOLUBILIDADE DA ENROFLOXACINA PURA

Com o procedimento descrito no item 6.2.1(a), inicialmente verificou-se que o maior pico de absorção ocorre em 272 nm. Na concentração de  $0,02 \text{ g L}^{-1}$  constatou-se que toda a FLOX foi solubilizada, pois a leitura de absorvância da solução filtrada em membrana de  $0,22 \mu\text{m}$  apresentou valor muito próximo ao da mesma solução antes de ser filtrada, como pode ser verificado na Figura 7.1.



**Figura 7.1 – Espectro de absorvância das soluções de FLOX  $0,02 \text{ g L}^{-1}$  sem filtrar e após filtração.**

Com o valor da absorção determinada no pico máximo e os dados correspondentes:

Massa molecular da FLOX = 359,3955

Umidade da FLOX = 1,512 % (determinada pelo método de Karl Fischer)

$C_F$  = Concentração de FLOX utilizada para a varredura =  $(0,02 \text{ g L}^{-1} - \text{umidade}) = 0,0197 \text{ g L}^{-1} = 5,4814 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

A = Absorvância de  $0,0197 \text{ g L}^{-1}$  de FLOX, lida em 272 nm = 2,1866

L = 1 cm

D = 1 (sem diluição)

Determinou-se a absorvidade molar ( $\epsilon$ ) da FLOX a 30 °C com o rearranjo da Equação 6.1:

$$\epsilon = \frac{A D}{C_F L} = 39891,12 \text{ unidades de absorção L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Com este valor substituído na Equação 6.1, obtém-se a relação a ser empregada para o cálculo da concentração das soluções de FLOX nos experimentos subsequentes:

$$C_F = \frac{A D}{39891,12} \quad (7.1)$$

onde:

$C_F$  = Concentração de FLOX ( $\text{mol L}^{-1}$ )

A = Absorvância da amostra a 272 nm

D = Diluição da amostra

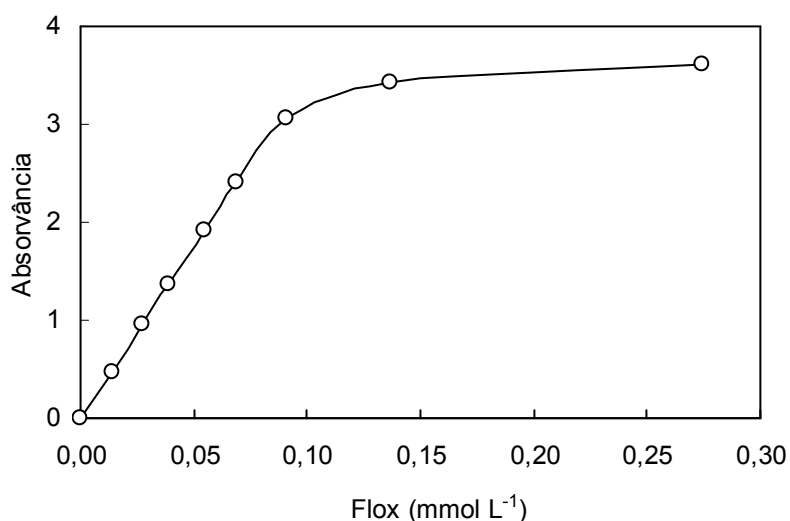
Aplicando-se o procedimento descrito no item 6.2.1(b) e a Equação 7.1, calculou-se a solubilidade da FLOX a 30 °C e pH 7, obtendo-se o valor de  $0,173 \pm 0,006 \text{ g L}^{-1}$ , próximo ao valor de  $0,146 \text{ g L}^{-1}$  obtido por Seedher e Agarwal (2009) para a solubilidade da FLOX em água a 25 °C.

## 7.2 VERIFICAÇÃO DA LINEARIDADE DA ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DA ENROFLOXACINA

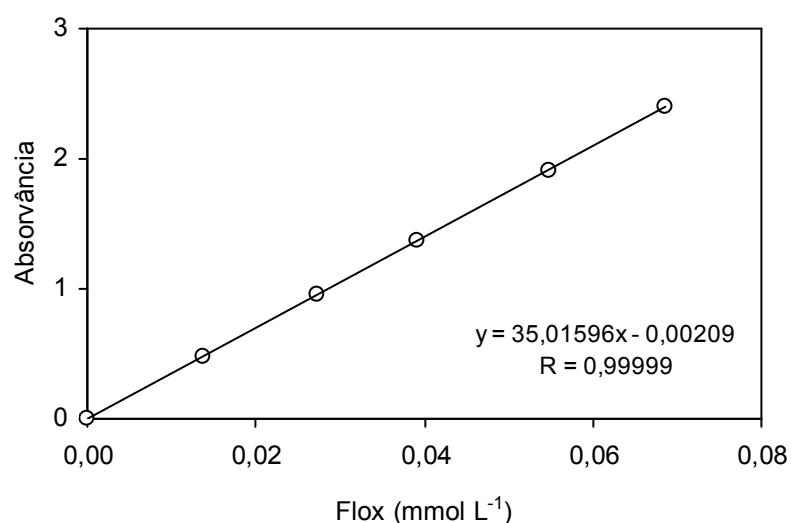
Os dados de absorvância em função da concentração para o ensaio de linearidade da análise espectrofotométrica da FLOX são apresentados na Tabela 7.1 e a sua linearidade em baixas concentrações pode ser constatada na Figura 7.2.

**Tabela 7.1 – Absorvância a 272 nm para diferentes concentrações da FLOX.**

Concentração de FLOX		Abs (272 nm)	Abs/Conc.FLOX (L mmol <sup>-1</sup> )
(g L <sup>-1</sup> )	(mmol L <sup>-1</sup> )		
0,0000	0,00000	0,0000	0,000
0,0050	0,01370	0,4758	34,726
0,0100	0,02740	0,9591	34,999
0,0143	0,03919	1,3683	34,917
0,0200	0,05481	1,9131	34,906
0,0250	0,06851	2,4007	35,042
0,0333	0,09125	3,0679	33,619
0,0500	0,13702	3,4362	25,076
0,1000	0,27403	3,6123	13,182

**Figura 7.2 – Limite da linearidade de soluções de FLOX, com medidas de absorvância a 272 nm.**

Na Figura 7.3, os dados são plotados na região estritamente linear, que se estende até 0,07 mmol L<sup>-1</sup> de FLOX. Pode-se observar pela equação da reta ajustada que o coeficiente de correlação é muito próximo de 1, indicando a aplicabilidade da Lei de Beer até a concentração de 0,07 mmol L<sup>-1</sup>. A alta linearidade dos dados nesta faixa justifica o uso da Equação ajustada para o cálculo das concentrações de FLOX em soluções aquosas.



**Figura 7.3 – Faixa de linearidade da absorção espectrofotométrica na análise da FLOX, para o comprimento de onda de 272 nm, em função da concentração (y = absorvância; x = concentração de FLOX).**

### 7.3 INFLUÊNCIA DA $\beta$ -CD SOBRE O ESPECTRO DE ABSORVÂNCIA DA SOLUÇÃO DE ENROFLOXACINA

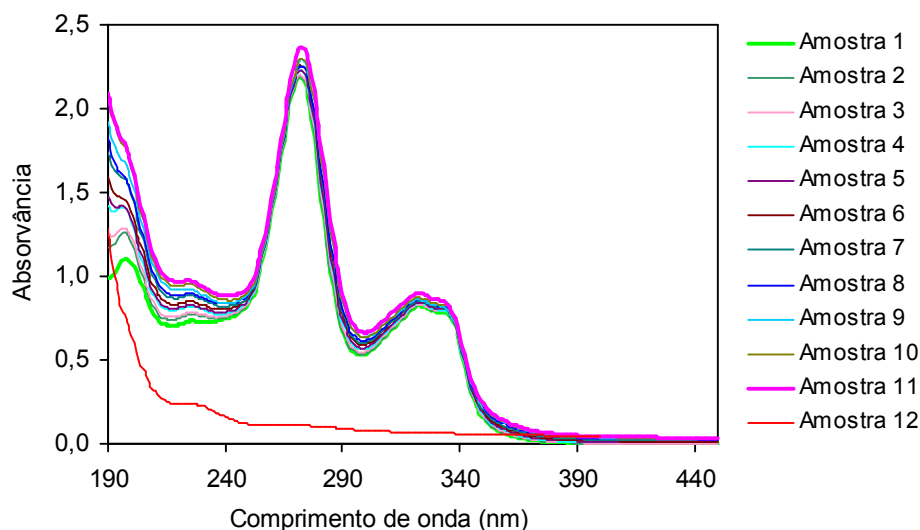
Os espectrogramas resultantes da varredura das soluções indicadas na Tabela 6.1 foram plotados de diferentes formas na Figura 7.4, visando obter-se uma melhor comparação dos resultados referentes à influência da  $\beta$ -CD sobre a absorvância da solução de FLOX.

As variações de absorção observadas nos espectros da Figura 7.4(a) são devidas às concentrações variadas de ambas as substâncias, pois tanto a FLOX como a  $\beta$ -CD demonstraram absorver na faixa de comprimentos de onda medidos, conforme mostram as curvas marcadas na legenda como Amostra 1 e Amostra 11, que têm 0,02 g L<sup>-1</sup> de FLOX e respectivamente 0 e 9 g L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD. Houve pouca alteração no pico principal (a 272 nm) com a adição da  $\beta$ -CD. Para a amostra número 1, a absorvância foi de 2,1887 enquanto para a amostra número 11 foi de 2,3638.

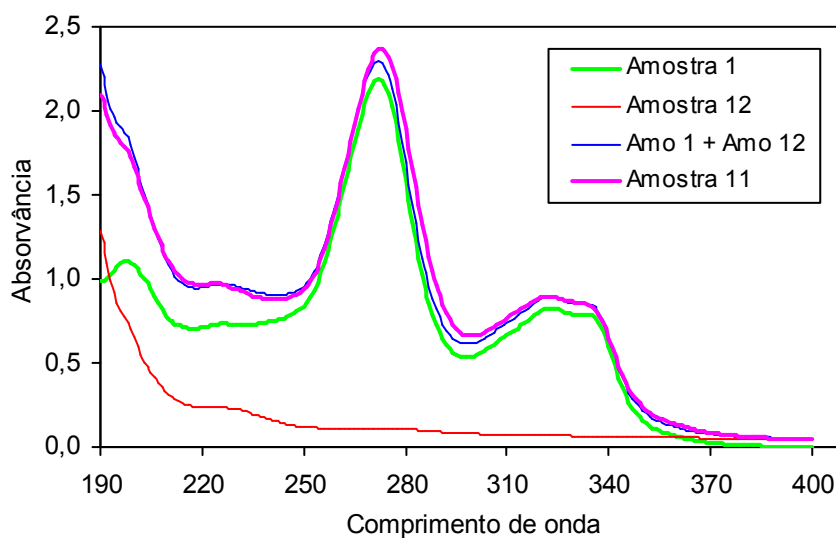
A Figura 7.4 (b) demonstra que os espectros de absorção da mistura das soluções de FLOX e  $\beta$ -CD e a soma dos espectros da FLOX e  $\beta$ -CD puras são praticamente coincidentes, indicando uma alteração desprezível na absorvidade molar da FLOX após a complexação.

Estes resultados garantem a validade da aplicação da Equação 7.1 para cálculos da concentração de FLOX tanto nas soluções puras como nas complexadas com  $\beta$ -CD. Este

entendimento foi estendido a todas as CDs utilizadas neste trabalho.



(a) Espectros de absorção das misturas de FLOX e  $\beta$ -CD, nas quais se manteve a concentração de FLOX em  $0,02 \text{ g L}^{-1}$  (exceto amostra 12, que não contém FLOX) e variou-se a concentração de  $\beta$ -CD de 0 a  $9 \text{ g L}^{-1}$ , conforme Tabela 6.1.



(b) Espectro de absorção da Amostra 11 e da soma dos espectros da Amostra 1 e da Amostra 12.

**Figura 7.4 – Influência da  $\beta$ -CD sobre o espectro de absorção da FLOX.**

Nas amostras das soluções indicadas na Tabela 6.1, não foram observadas variações significativas dos espectros de absorção obtidos após a preparação das soluções e após três dias de estocagem em geladeira, indicando que não houve precipitação da FLOX ou do seu complexo com a  $\beta$ -CD.

## 7.4 SOLUBILIDADE DA ENROFLOXACINA NA PRESENÇA DE CICLODEXTRINAS

Nas seções 7.4.1 a 7.4.4 são apresentados os espectros de absorção para a mistura de FLOX com as CDs  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e HP- $\beta$ , bem como os dados e os diagramas de solubilidade da FLOX na presença das CDs. Apresentam-se também os valores de pH medidos nas soluções preparadas de FLOX e CDs. O procedimento está descrito no item 6.2.4. Na seção 7.4.5 os resultados serão discutidos e serão apresentados os cálculos das constantes de estabilidade dos complexos da FLOX com as CDs testadas e o número de vezes que a solubilidade aumentou com a adição de cada CD.

### 7.4.1 Diagrama de solubilidade da enrofloxacin com adição de $\alpha$ -CD

Nas Tabelas 7.2 e 7.3 e Figuras 7.5 e 7.6 são apresentados os dados da mistura CD/FLOX, espectros de absorção e diagrama de solubilidade, utilizando-se a  $\alpha$ -CD.

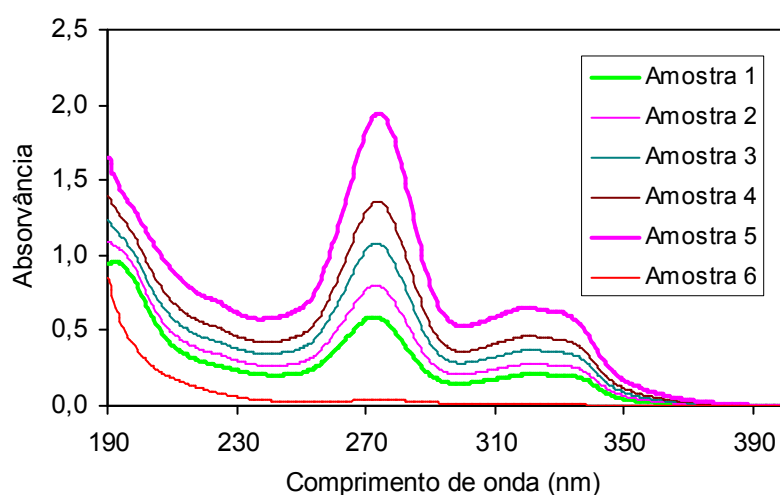
**Tabela 7.2 – Soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada e variou-se a concentração de  $\alpha$ -CD. Concentração da solução de  $\alpha$ -CD utilizada nas diluições: 120,80 g L<sup>-1</sup>.**

Amostra	FLOX (g)	água + azida (mL)	Solução de $\alpha$ -CD (mL)	pH (amostras filtradas sem diluir)
1	0,1000	10	0	6,87
2	0,1000	8	2	6,53
3	0,1000	6	4	6,27
4	0,1000	4	6	6,16
5	0,1000	0	10	5,80
6	0,0000	0	10	4,68

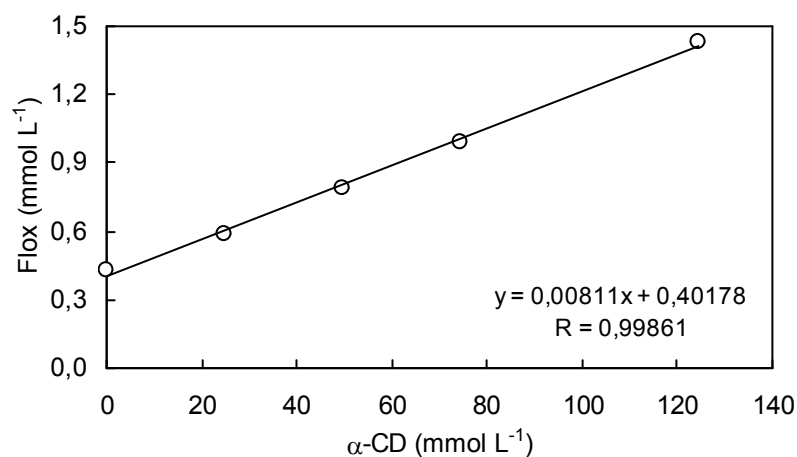


**Tabela 7.3 – Concentrações de FLOX solubilizada após complexação com  $\alpha$ -CD. Amostras filtradas e diluídas em 1:30 para leitura da absorvância em espectrofotômetro.**

Amostra	Concentração de $\alpha$ -CD		Abs (272 nm)	Concentração de FLOX no filtrado	
	(g L <sup>-1</sup> )	(mmol L <sup>-1</sup> )		(g L <sup>-1</sup> )	(mmol L <sup>-1</sup> )
1	00,00	0	0,5708	0,1543	0,4293
2	24,16	24,85	0,7788	0,2105	0,5857
3	48,32	49,71	1,0508	0,2840	0,7902
4	72,48	74,57	1,3232	0,3576	0,9951
5	120,80	124,28	1,8961	0,5125	1,4260
6	120,80	124,28	0,0276	0,0000	0,0000



**Figura 7.5 – Espectros de absorvância das soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada (10 g L<sup>-1</sup>) e variou-se a concentração de  $\alpha$ -CD de 0 a 120 g L<sup>-1</sup>, conforme Tabela 7.3.**



**Figura 7.6 – Solubilidade da FLOX em função da concentração de  $\alpha$ -CD (y = concentração de FLOX; x = concentração de  $\alpha$ -CD).**

#### 7.4.2 Diagrama de solubilidade da enrofloxacin com adição de $\beta$ -CD

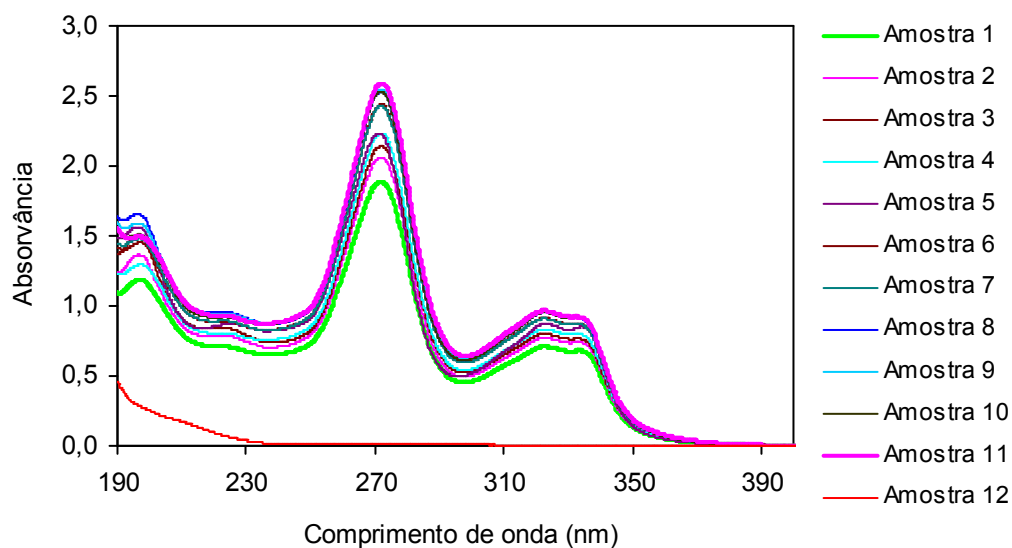
Nas Tabelas 7.4 e 7.5 e Figuras 7.7 e 7.8 são apresentados os dados da mistura CD/FLOX, espectros de absorção e diagrama de solubilidade, utilizando-se a  $\beta$ -CD.

**Tabela 7.4 – Soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada e variou-se a concentração de  $\beta$ -CD. Concentração da solução de  $\beta$ -CD utilizada nas diluições: 18,00 g L<sup>-1</sup>.**

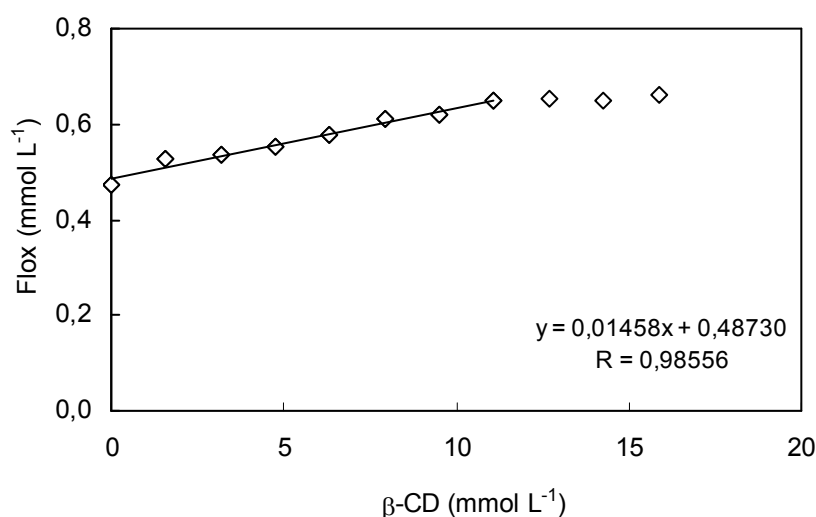
Amostra	FLOX (g)	água + azida sódica (mL)	Solução de $\beta$ -CD (mL)	pH (amostras filtradas sem diluir)
1	0,1000	10	0	6,87
2	0,1000	9	1	6,68
3	0,1000	8	2	
4	0,1000	7	3	
5	0,1000	6	4	6,66
6	0,1000	5	5	
7	0,1000	4	6	
8	0,1000	3	7	6,62
9	0,1000	2	8	
10	0,1000	1	9	
11	0,1000	0	10	6,58
12	0	0	10	4,72

**Tabela 7.5 – Concentrações de FLOX solubilizada após complexação com  $\beta$ -CD. Amostras filtradas e diluídas em 1:15 para leitura da absorvância em espectrofotômetro.**

Amostra	Concentração de $\beta$ -CD		Abs (272 nm)	Concentração de FLOX no filtrado	
	(g L <sup>-1</sup> )	(mmol L <sup>-1</sup> )		(g L <sup>-1</sup> )	(mmol L <sup>-1</sup> )
1	0,0	0	1,2570	0,1699	0,4727
2	1,8	1,586	1,4032	0,1900	0,5276
3	3,6	3,172	1,4297	0,1932	0,5376
4	5,4	4,758	1,4698	0,1986	0,5527
5	7,2	6,344	1,5330	0,2072	0,5764
6	9,0	7,930	1,6208	0,2190	0,6095
7	10,8	9,515	1,6440	0,2222	0,6182
8	12,6	11,101	1,7321	0,2341	0,6513
9	14,4	12,687	1,7407	0,2352	0,6545
10	16,2	14,273	1,7302	0,2338	0,6506
11	18,0	15,859	1,7555	0,2372	0,6601
12	18,0	15,859	0,0200	0,0000	0,0000



**Figura 7.7 – Espectros de absorção das soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada (10 g L<sup>-1</sup>) e variou-se a concentração de  $\beta$ -CD de 0 a 18,0 g L<sup>-1</sup>, conforme Tabela 7.5.**



**Figura 7.8 – Solubilidade da FLOX em função da concentração de β-CD (y = concentração de FLOX; x = concentração de β-CD).**

#### 7.4.3 Diagrama de solubilidade da enrofloxacin com adição de γ-CD

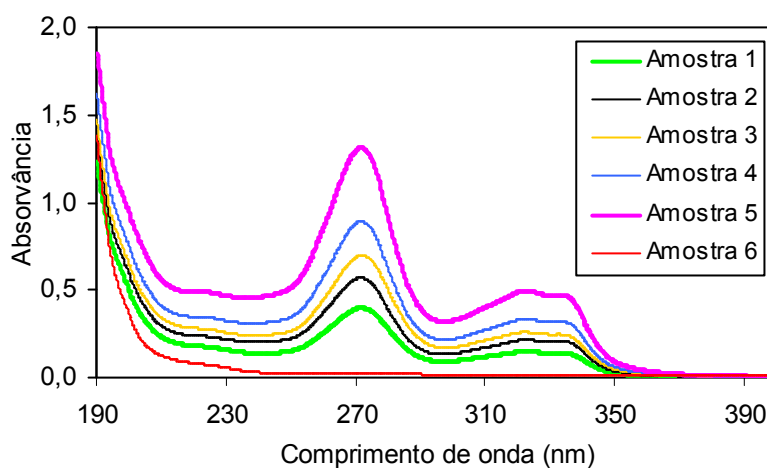
Nas Tabelas 7.6 e 7.7 e Figuras 7.9 e 7.10 são apresentados os dados da mistura CD/FLOX, espectros de absorção e diagrama de solubilidade, utilizando-se a γ-CD.

**Tabela 7.6 – Soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada e variou-se a concentração de γ-CD. Concentração da solução de γ-CD utilizada nas diluições: 207,50 g L<sup>-1</sup>.**

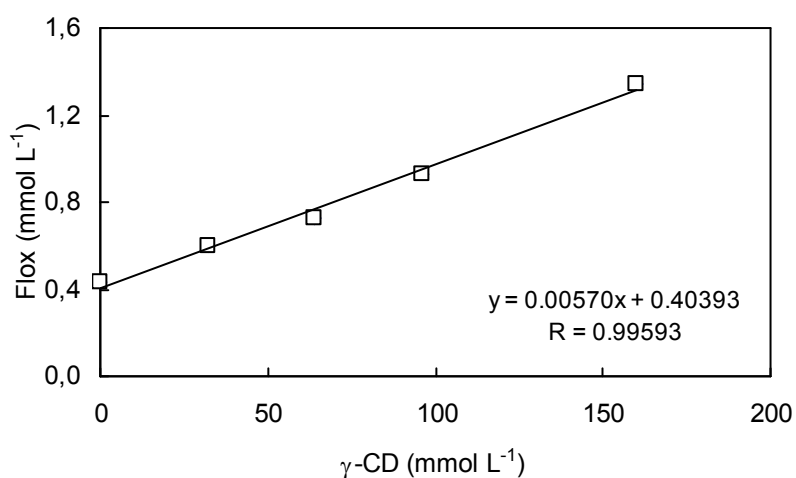
Amostra	FLOX (g)	Água + azida (mL)	Solução de γ-CD (mL)	pH (amostras filtradas sem diluir)
1	0,1000	10	0	7,06
2	0,1000	8	2	7,06
3	0,1000	6	4	7,08
4	0,1000	6	6	7,08
5	0,1000	4	10	7,08
6	0	0	10	7,30

**Tabela 7.7 – Concentrações de FLOX solubilizada após complexação com  $\gamma$ -CD. Amostras filtradas e diluídas em 1:40 para leitura da absorvância em espectrofotômetro.**

Amostra	Concentração de $\gamma$ -CD		Abs (272 nm)	Concentração de FLOX no filtrado	
	(g L <sup>-1</sup> )	(mmol L <sup>-1</sup> )		(g L <sup>-1</sup> )	(mmol L <sup>-1</sup> )
1	0,00	0,00	0,4270	0,1539	0,4281
2	41,50	32,00	0,5986	0,2157	0,6002
3	83,01	64,00	0,7219	0,2602	0,7239
4	124,51	96,00	0,9264	0,3338	0,9289
5	207,52	160,00	1,3395	0,4827	1,3431
6	207,52	160,00	0,0296	0,0000	0,0000



**Figura 7.9 – Espectros de absorção das soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada (10 g L<sup>-1</sup>) e variou-se a concentração de  $\gamma$ -CD de 0 a 207 g L<sup>-1</sup>, conforme Tabela 7.7.**



**Figura 7.10 – Solubilidade da FLOX em função da concentração de  $\gamma$ -CD (y = concentração de FLOX; x = concentração de  $\gamma$ -CD).**

#### 7.4.4 Diagrama de solubilidade da enrofloxacin com adição de HP- $\beta$ -CD

Nas Tabelas 7.8 e 7.9 e Figuras 7.11 e 7.12 são apresentados os dados da mistura CD/FLOX, espectros de absorção e diagrama de solubilidade, utilizando-se a HP- $\beta$ -CD.

**Tabela 7.8 – Soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada e variou-se a concentração de HP- $\beta$ -CD. Concentração da solução de HP- $\beta$ -CD utilizada nas diluições: 263,10 g L<sup>-1</sup>.**

Amostra	FLOX (g)	Água + azida (mL)	Solução de HP- $\beta$ -CD (mL)	pH (amostras filtradas sem diluir)
1	0,1000	10	0	6,88
2	0,1000	8	2	6,88
3	0,1000	6	4	6,87
4	0,1000	4	6	6,87
5	0,1000	0	10	6,87
6	0	0	10	6,87

**Tabela 7.9 – Concentrações de FLOX solubilizada após complexação com HP- $\beta$ -CD. Amostras filtradas e diluídas em 1:40 para leitura da absorvância em espectrofotômetro.**

Amostra	Concentração de HP- $\beta$ -CD		Abs (272 nm)	Concentração de FLOX no filtrado	
	(g L <sup>-1</sup> )	(mmol L <sup>-1</sup> )		(g L <sup>-1</sup> )	(mmol L <sup>-1</sup> )
1	0,00	0	0,4073	0,1468	0,4084
2	52,62	36,04	0,6529	0,2353	0,6547
3	105,24	72,08	0,8778	0,3163	0,8802
4	157,86	108,12	1,1187	0,4032	1,1217
5	263,10	180,21	1,6924	0,6099	1,6970
6	263,10	180,21	0,0539	0,0000	0,0000

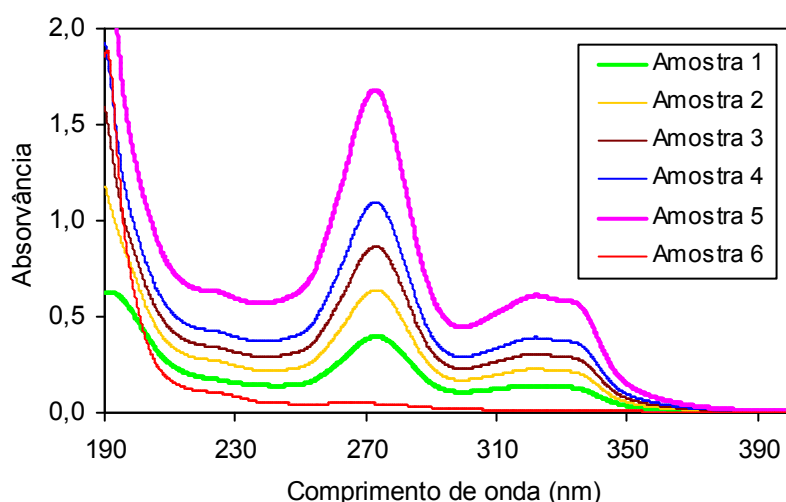


Figura 7.11 – Espectro de absorção das soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) e variou-se a concentração de HP- $\beta$ -CD de 0 a  $263 \text{ g L}^{-1}$ , conforme Tabela 7.9.

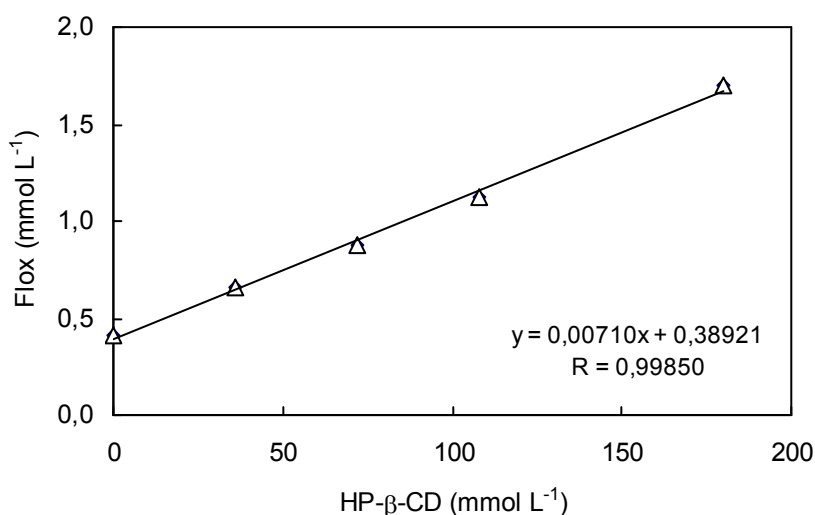


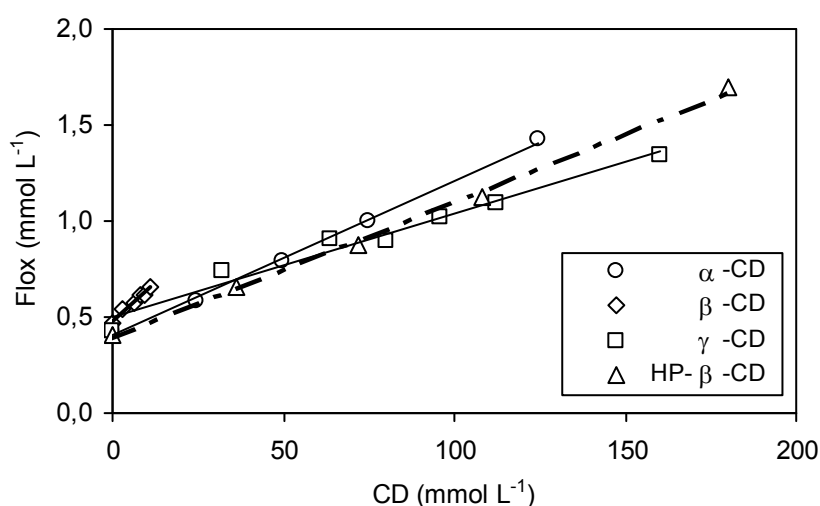
Figura 7.12 – Solubilidade da FLOX em função da concentração de HP- $\beta$ -CD ( $y$  = concentração de FLOX;  $x$  = concentração de HP- $\beta$ -CD).

#### 7.4.5 Comparação das diferentes ciclodextrinas

Os valores de pH medidos nas soluções em que foram variadas as concentrações de CDs para um valor constante da quantidade de FLOX sólida adicionada no início do teste, apresentados nas Tabelas 7.2, 7.4, 7.6 e 7.8, mostraram que as CDs não alteraram de maneira significativa o pH dessas soluções. O pH medido do sobrenadante da suspensão de FLOX pura, quando adicionada à água destilada, na quantidade de  $10 \text{ g L}^{-1}$ , foi de 7,02.

Na Figura 7.13 são apresentadas as retas obtidas nas Figuras 7.6, 7.8, 7.10 e 7.12. O aumento linear na solubilidade da FLOX em função das concentrações crescentes de ciclodextrina sugere que os complexos formados são de 1ª ordem, considerando-se uma estequiometria de complexação 1:1. Na Figura 7.8, o aumento da concentração de  $\beta$ -CD a partir da concentração de  $11 \text{ mmol L}^{-1}$  não resultou em aumento da solubilidade, indicando que foi alcançado o limite de solubilidade do complexo  $\beta$ -CD/FLOX nas condições estudadas.

Na Tabela 7.10, apresenta-se as constantes de estabilidade (K) e o aumento da solubilidade (n) obtidas pela aplicação do coeficiente linear das retas nas Equações 6.2 e 6.3. Observa-se que apesar da  $\beta$ -CD ser a ciclodextrina menos solúvel, o complexo de inclusão  $\beta$ -CD/FLOX apresentou o maior coeficiente angular, com a maior constante de estabilidade do complexo ( $K = 24,8 \text{ L mol}^{-1}$ ). Embora com as demais CDs, o aumento da solubilidade (n) observado foi maior que o da  $\beta$ -CD, esse aumento deve ser ponderado pelo fato de que as concentrações utilizadas dessas CDs foram muito maiores que a de  $\beta$ -CD (7 a 12 vezes), uma vez que elas são mais solúveis. Assim, a relação  $n/CM_{CD}$ , onde  $CM_{CD}$  é a concentração máxima de CD usada no experimento, foi maior para a  $\beta$ -CD. A solução de FLOX mais concentrada foi obtida com a HP- $\beta$ -CD, dando  $1,697 \text{ mmol L}^{-1}$ , enquanto com a  $\beta$ -CD foi de  $0,660 \text{ mmol L}^{-1}$ . Este resultado é consistente com o fato da HP- $\beta$ -CD ser a mais solúvel das CDs utilizadas neste trabalho.



**Figura 7.13 – Solubilidade da FLOX em função da concentração de CDs (y = concentração de Flox; x = concentração de CDs).**



**Tabela 7.10 – Constantes K e n, obtidas como resultado da aplicação das Equações 6.2 e 6.3 aos coeficientes lineares das Figuras 7.6, 7.8, 7.10 e 7.12.  $CM_{CD}$  é a concentração máxima de CD utilizada e EC é a eficiência da complexação.**

CD	$CM_{CD}$ (mmol L <sup>-1</sup> )	$S_0$ (mmol L <sup>-1</sup> )	FLOX dissolvida (mmol L <sup>-1</sup> )	K (L mol <sup>-1</sup> )	n	$(n/CM_{CD}) \times 100$	EC
$\alpha$	124,28	0,4293	1,4260	19,05	3,3	2,7	0,0082
$\beta$	15,86	0,4727	0,6601	24,80	1,4	8,8	0,0117
$\gamma$	160,00	0,4281	1,3431	13,38	3,1	1,9	0,0057
HP- $\beta$	180,21	0,4084	1,6970	17,52	4,2	2,3	0,0072

Os valores de K obtidos indicam uma estabilidade relativamente baixa para os complexos CD/FLOX formados. Melo *et al.* (2007) também obtiveram baixos valores de K:  $14,9 \pm 2,3$  e  $10,8 \pm 1,2$  L mol<sup>-1</sup> a 20 °C e 25 °C respectivamente, complexando nitrofurazona em HP- $\beta$ -CD. De acordo com esses autores, o motivo desta baixa afinidade pode ser devido à dimensão e geometria da cavidade da ciclodextrina, à solubilidade relativa e à energia conformacional do fármaco. É interessante observar que a presença dos grupos laterais hidroxil-propila na HP- $\beta$ -CD reduziu a afinidade da CD pela FLOX, uma vez que a constante de complexação diminuiu de 24,80 L mol<sup>-1</sup>, no caso da  $\beta$ -CD, para 17,52 L mol<sup>-1</sup>, no caso da HP- $\beta$ -CD.

Segundo Stella e He (2008), os valores para a constante de estabilidade (K) de 10 a 1000 L mol<sup>-1</sup> não são incomuns, os valores de  $1 \times 10^4$  L mol<sup>-1</sup> são vistos ocasionalmente e os valores maiores que  $1 \times 10^5$  L mol<sup>-1</sup> são muito raros. Aumentos da solubilidade na presença de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de CDs de 10 vezes a 1000 vezes são comuns, enquanto os aumentos maiores são observados ocasionalmente.

A eficiência de complexação (EC) foi calculada por meio da Equação 6.4. Observa-se que o maior valor obtido foi para a  $\beta$ -CD e o menor valor foi para a  $\gamma$ -CD. Segundo Loftsson *et al.* (2007), para formulações de medicamentos em CDs, para uso oral, a substância deve ser relativamente potente (de forma que se possa usar menos que 50 mg) e preferencialmente, EC deve ser maior que 0,1. Esses autores reportaram valores de EC de 43 diferentes fármacos complexados em CDs, principalmente em HP- $\beta$ -CD, sendo que 20 desses complexos apresentaram valores de EC menores que 0,1. O menor valor obtido foi de 0,004 para sulfametoxazol em HP- $\beta$ -CD e o maior foi de 4,698 para fluoxetina HCl (A) em HP- $\beta$ -CD.

### 7.5 SOLUBILIDADE DA ENROFLOXACINA NA PRESENÇA DE ÁCIDO CÍTRICO

Os resultados do teste de solubilidade da FLOX na presença de ácido cítrico são apresentados na Tabela 7.11 e Figuras 7.14 e 7.15. Observou-se uma forte influência da concentração da solução de ácido cítrico usado isoladamente, e portanto, do pH, sobre a solubilidade da FLOX. O aumento de solubilidade, em particular em função do pH, corrobora os resultados de Lizondo *et al.* (1997), que obtiveram uma máxima solubilidade de 28,98 mmol L<sup>-1</sup> em pH 5,02.

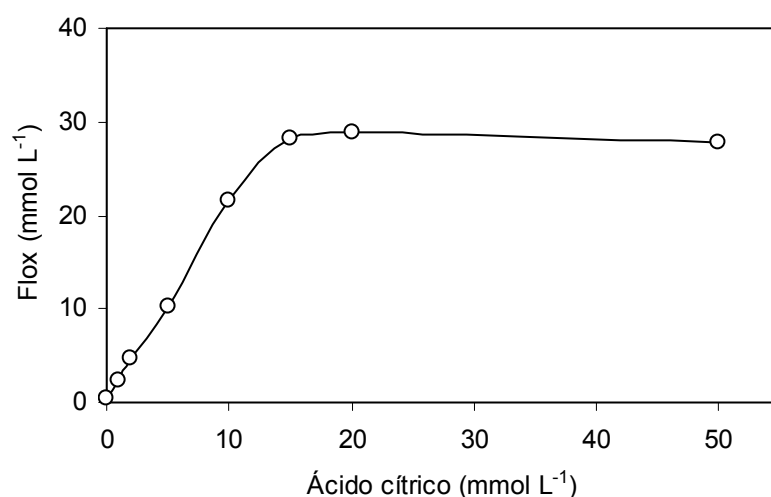
**Tabela 7.11 – Concentrações das soluções do teste de solubilidade da FLOX na presença de ácido cítrico\*.**

Amostra	Concentração de ácido cítrico (mmol L <sup>-1</sup> )	pH	Diluição da amostra	ABS (272 nm)	Concentração de FLOX no filtrado	
					(g L <sup>-1</sup> )	(mmol L <sup>-1</sup> )
1	0	7,02	20	0,9669	0,1742	0,4848
2	1	5,67	50	1,8523	0,8344	2,3217
3	2	5,48	100	1,9001	1,7119	4,7632
4	5	5,30	400	1,0280	3,7047	10,3080
5	10	5,19	1000	0,8578	7,7283	21,5033
6	15	4,90	1000	1,1244	10,1302	28,1864
7	20	4,26	1000	1,1512	10,3716	28,8583
8	50	3,07	1000	1,1124	10,0221	27,8856

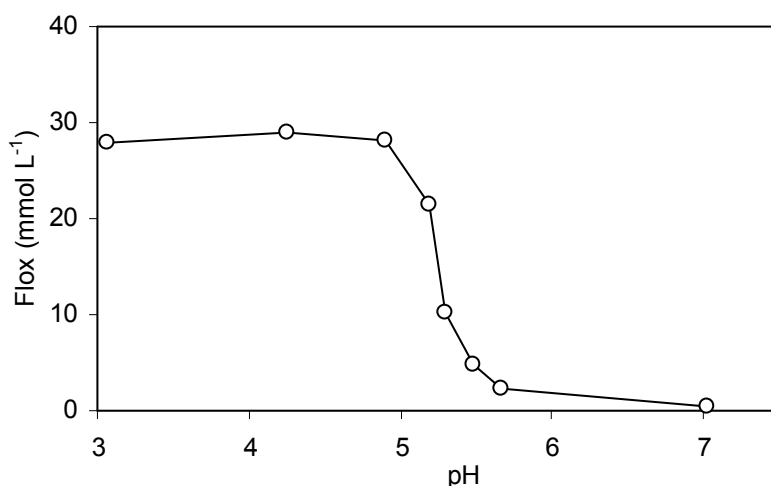
\* A quantidade de FLOX sólida adicionada foi de 10 g L<sup>-1</sup> e variou-se a concentração de ácido cítrico.

### 7.6 SOLUBILIDADE DA ENROFLOXACINA NA PRESENÇA DE ÁCIDO CÍTRICO E β-CD

Os resultados do teste de solubilidade da FLOX na presença de ácido cítrico e β-CD são apresentados na Tabela 7.12 e nas Figuras 7.16 e 7.17.



**Figura 7.14 – Solubilidade da FLOX em função da concentração de ácido cítrico.**



**Figura 7.15 – Solubilidade da FLOX em função do pH da solução.**

Diferente do efeito de solubilização da FLOX pela  $\beta$ -CD observado na Figura 7.8, a presença do ácido cítrico tem efeito predominante, com solubilidade equivalente àquela apresentada na Tabela 7.11 e Figura 7.14, para concentração de ácido cítrico próxima de 5 mmol L<sup>-1</sup> e a variação da concentração de  $\beta$ -CD de 0 a 18 mmol L<sup>-1</sup> tem apenas um ligeiro efeito negativo sobre a solubilidade, provavelmente por alterar o pH. Como os valores ficaram muito próximos e apresentaram dispersão, o coeficiente de correlação da reta ajustada na Figura 7.16 forneceu um valor muito baixo.

Para outras substâncias já foi observado um efeito sinérgico sobre o aumento da solubilidade no caso da aplicação conjunta de ácidos orgânicos e CDs, em especial para o ácido cítrico. Este tipo de aumento de solubilidade geralmente é atribuído a uma mudança na

interação soluto-solvente, como a ionização da molécula hóspede (EVRARD *et al.*, 2002; MORIWAKI *et al.*, 2008).

**Tabela 7.12 – Concentrações das soluções do teste de solubilidade da FLOX na presença de ácido cítrico e  $\beta$ -CD.<sup>a</sup>**

Amostra	Concentração de $\beta$ -CD		pH	Diluição da amostra	Abs (272 nm)	Concentração de FLOX no filtrado	
	(g L <sup>-1</sup> )	(mmol L <sup>-1</sup> )				(g L <sup>-1</sup> )	(mmol L <sup>-1</sup> )
B1 <sup>b</sup>	0,0	0	7,03	20	1,0735	0,1934	0,5382
B2 <sup>c</sup>	18,0	15,859	6,84	20	1,3795	0,2486	0,6916
B3 <sup>d</sup>	0,0	0	3,02	1	2,4362	0,0000	0,0000
1	0,0	0	5,42	500	0,8074	3,6371	10,1199
2	1,8	1,5859	5,40	500	0,8413	3,7898	10,5448
3	3,6	3,1718	5,34	500	0,7905	3,5610	9,9081
4	5,4	4,7577	5,34	500	0,8076	3,6380	10,1225
5	7,2	6,3436	5,34	500	0,7815	3,5204	9,7953
6	9,0	7,9295	5,32	500	0,7922	3,5686	9,9294
7	10,8	9,5154	5,32	500	0,7798	3,5128	9,7740
8	12,6	11,1013	5,32	500	0,7833	3,5285	9,8179
9	14,4	12,6872	5,34	500	0,7788	3,5083	9,7615
10	16,2	14,2731	5,35	500	0,7786	3,5074	9,7590
11	18,0	15,8590	5,37	500	0,7815	3,5204	9,7953

<sup>a</sup>Manteve-se constante a quantidade de FLOX sólida adicionada (0,1000 g) e a concentração de ácido cítrico (5 mmol L<sup>-1</sup>), e variou-se a concentração de  $\beta$ -CD.

Branco do teste:

<sup>b</sup>B1 - 0,1000 g de FLOX sólida adicionada em 10 mL de água destilada contendo 0,01 % (m/v) de azida sódica.

<sup>c</sup>B2 - 0,1000 g de FLOX sólida adicionada em 10 mL de água destilada contendo 0,01 % (m/v) de azida sódica e 18 g L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD.

<sup>d</sup>B3 - 10 mL de solução 2 (Tabela 6.3).

A Figura 7.17 demonstra que, também na presença do ácido cítrico e da  $\beta$ -CD, o espectro de absorção da FLOX é pouco afetado, sendo as variações observadas resultantes da soma das contribuições individuais da absorção das substâncias em solução.

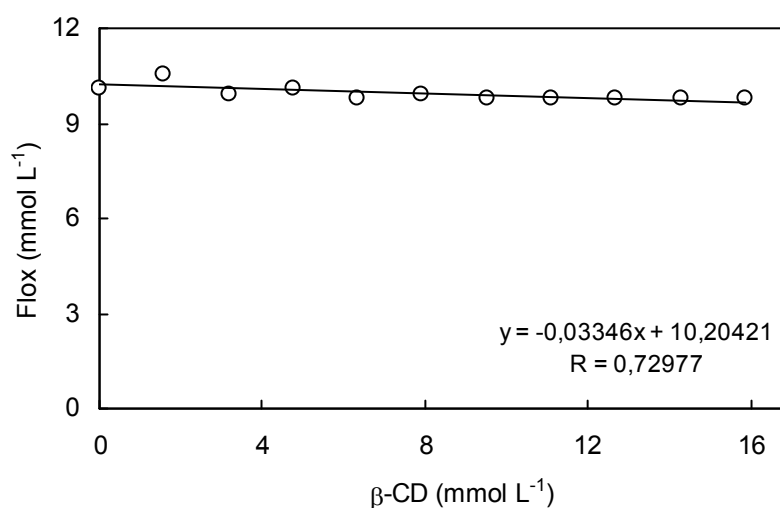


Figura 7.16 – Solubilidade da FLOX em função da concentração de  $\beta$ -CD com ácido cítrico 5 mmol L<sup>-1</sup>.

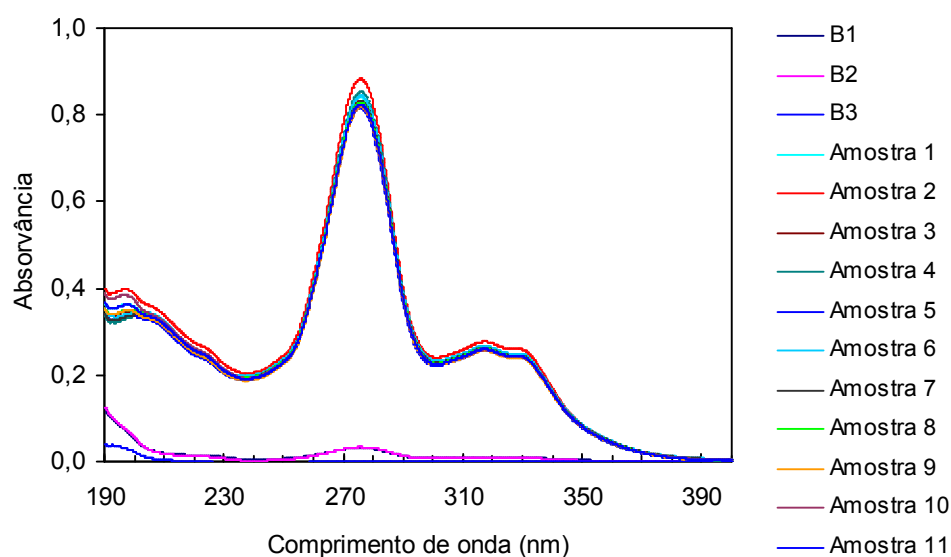


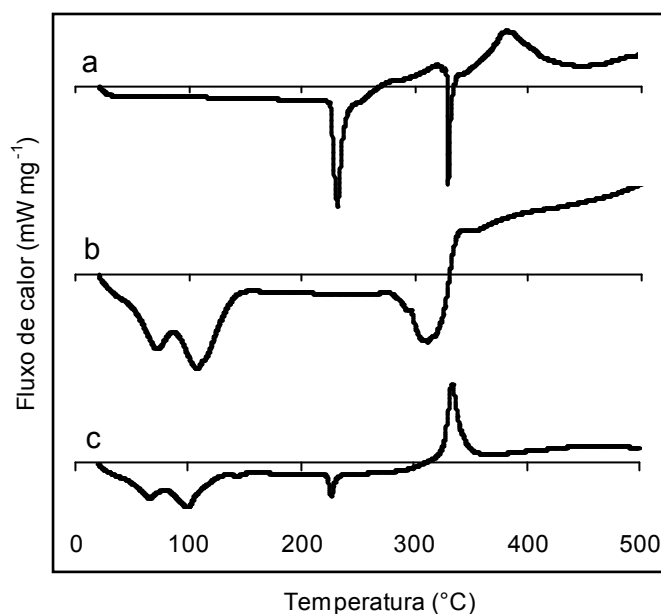
Figura 7.17 – Espectro de absorção das soluções em que se manteve constante a quantidade de FLOX sólida adicionada (10 g L<sup>-1</sup>) e a concentração de ácido cítrico (5 mmol L<sup>-1</sup>), e variou-se a concentração de  $\beta$ -CD.

## 7.7 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

As análises térmicas foram utilizadas com o objetivo de comprovar a formação dos complexos de inclusão da enrofloxacinina com as CDS.

### 7.7.1 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Nas Figuras 7.18 a 7.21 são apresentadas as curvas de DSC obtidas para cada CD, juntamente com as curvas de enrofloxacin pura e dos complexos enrofloxacin/CD (razão molar 1:1) obtidos utilizando-se a técnica de amassamento (kneading). O termograma da enrofloxacin (curva a) apresenta dois picos endotérmicos: o primeiro em 231 °C corresponde ao ponto de fusão e o segundo em 329 °C ao ponto de fulgor. Os termogramas das CDs (curvas b) apresentam um pico endotérmico entre 80-100 °C, associado à perda de umidade e outro entre 315-330 °C, causado pela degradação térmica da CD. Os termogramas dos complexos enrofloxacin/CDs (curvas c) mostram uma redução do pico correspondente ao ponto de fusão da enrofloxacin. Esta redução é parcialmente devida à maior massa de CD que foi usada em relação à quantidade de enrofloxacin, a fim de se obter uma razão molar 1:1. No entanto, como a redução da área do pico foi considerável, especialmente para os complexos enrofloxacin/ $\gamma$ -CD e enrofloxacin/HP- $\beta$ -CD, a formação dos complexos foi confirmada. Além disso, os picos acima de 300 °C, atribuídos ao ponto de fulgor da enrofloxacin e degradação térmica de CDs, passaram de endotérmicos para exotérmicos, indicando que uma espécie diferente foi formada (provavelmente o complexo de inclusão).



**Figura 7.18 – Curvas de DSC para (a) enrofloxacin, (b)  $\alpha$ -CD, e (c) produto obtido a partir do método kneading com enrofloxacin e  $\alpha$ -CD (razão molar 1:1).**

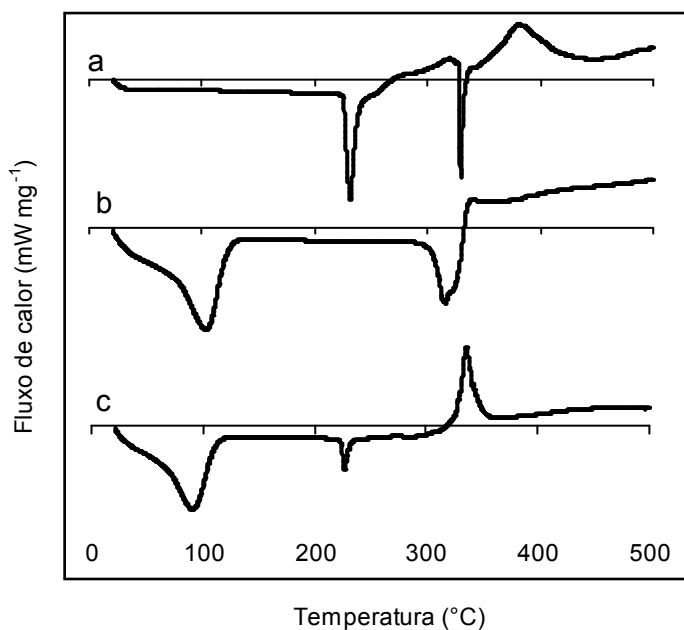


Figura 7.19 – Curvas de DSC para (a) enrofloxacina, (b)  $\beta$ -CD, e (c) produto obtido a partir do método kneading com enrofloxacina e  $\beta$ -CD (razão molar 1:1).

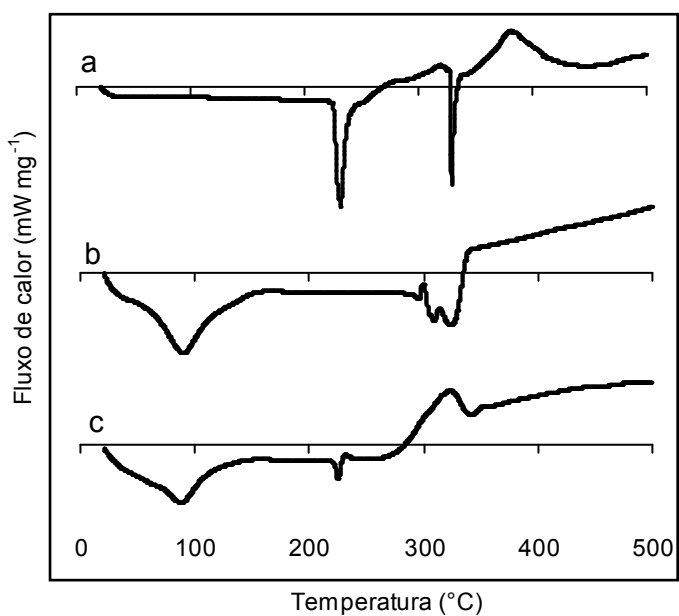
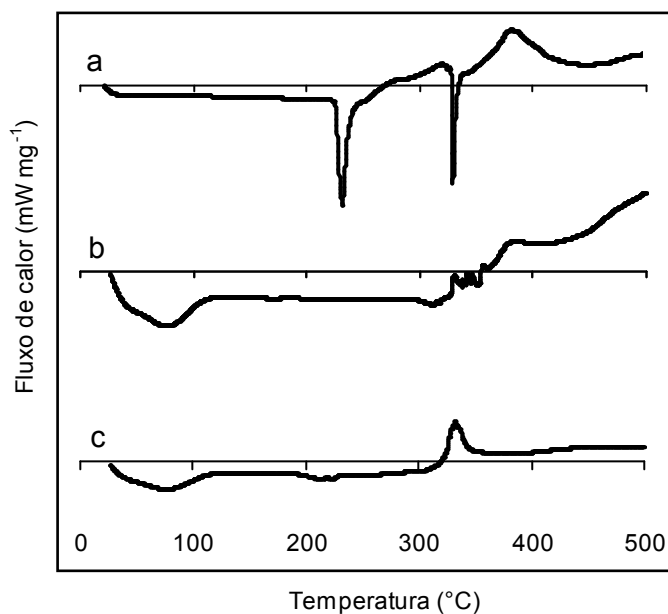


Figura 7.20 – Curvas de DSC para (a) enrofloxacina, (b)  $\gamma$ -CD, e (c) produto obtido a partir do método kneading com enrofloxacina e  $\gamma$ -CD (razão molar 1:1).

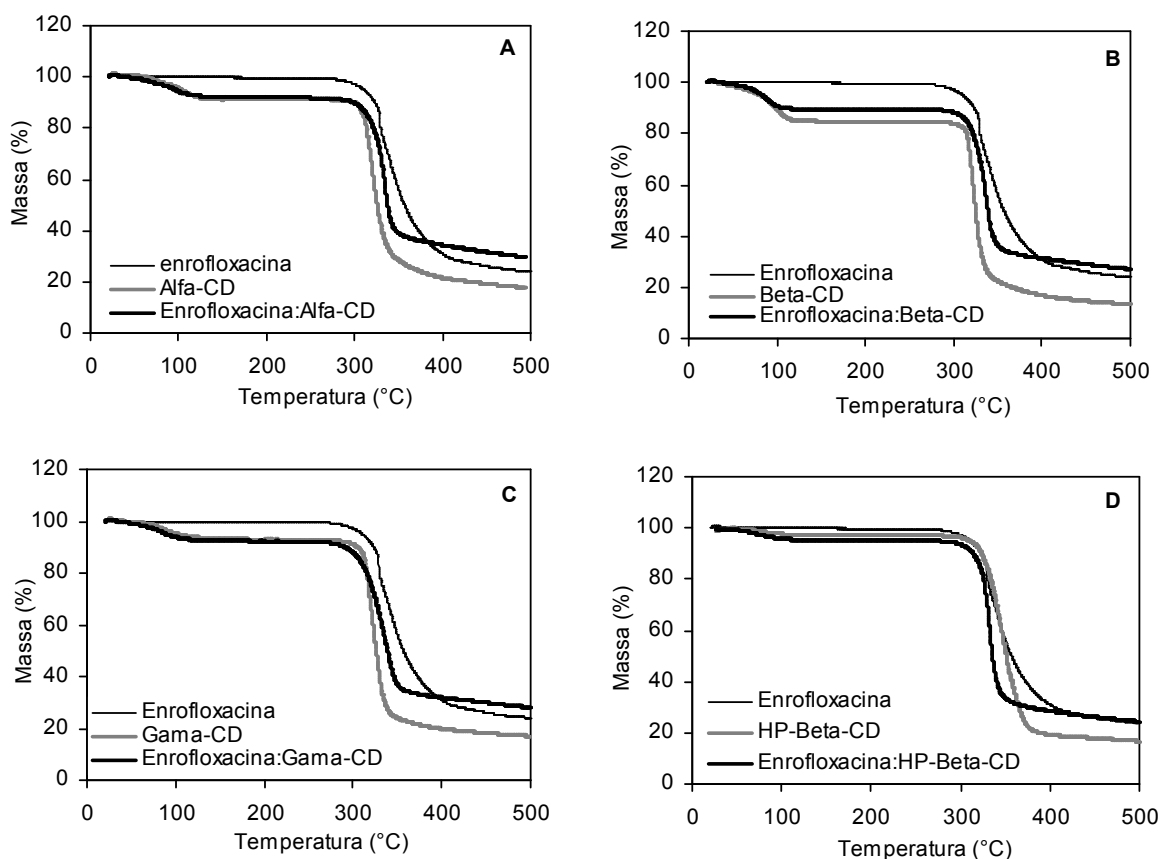


**Figura 7.21** – Curvas de DSC para (a) enrofloxacina, (b) HP- $\beta$ -CD, e (c) produto obtido a partir do método kneading com enrofloxacina e HP- $\beta$ -CD (razão molar 1:1).

### 7.7.2 Termogravimetria (TGA)

Nas curvas de TGA mostradas na Figura 7.22, há uma pequena perda de massa a 100 °C devida à evaporação da água e uma perda de massa gradual após 300 °C devida à degradação térmica da enrofloxacina e das CDs. O deslocamento homogêneo (sem a presença de degraus ao longo da curva) observado para as misturas enrofloxacina/CDs em relação às curvas das substâncias puras, é outra indicação da formação dos complexos.





**Figura 7.22** – Curvas termogravimétricas para enrofloxacin, CDs (A =  $\alpha$ -CD, B =  $\beta$ -CD, C =  $\gamma$ -CD e D = HP- $\beta$ -CD), e o produto obtido a partir do método kneading com enrofloxacin e cada uma das CDs (razão molar 1:1).

Os experimentos apresentados na Parte 2 deste trabalho demonstraram que embora os valores da constante de estabilidade obtidos tenham indicado baixa estabilidade dos complexos CD/FLOX formados, foi possível aumentar a solubilidade da FLOX em até 4,2 vezes. As análises de DSC e TGA confirmaram a formação dos complexos.

## 8 CONCLUSÕES

A solubilidade da FLOX em água, a 30 °C, é de  $0.173 \pm 0.006 \text{ g L}^{-1}$ .

Na determinação da curva de linearidade da absorvância de uma solução aquosa de FLOX em função da sua concentração, observou-se que a linearidade foi mantida para valores de absorvância abaixo de 2,5. Abaixo desse valor, a razão  $\text{ABS}/(\text{conc. de FLOX em mmol L}^{-1})$  se manteve aproximadamente constante em torno de 35, que leva a uma absorvidade molar específica de  $3,99 \times 10^4$  unidades de absorção  $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Verificou-se que a  $\beta$ -CD não interferiu no espectro de absorvância da FLOX.

O aumento linear na solubilidade da FLOX em função das concentrações crescentes de ciclodextrina indicou que os complexos formados são de 1ª ordem, considerando-se uma estequiometria de complexação 1:1.

A inclusão da FLOX na  $\beta$ -CD apresentou o maior valor para a constante de estabilidade do complexo ( $K = 24,8 \text{ L mol}^{-1}$ ) e o maior aumento para a solubilidade da FLOX ( $n = 1,4$ ) em relação à quantidade de CD oferecida. Porém, a maior solubilidade total da FLOX,  $0,61 \text{ g L}^{-1}$  ( $1,697 \text{ mmol L}^{-1}$ ), foi obtida utilizando-se a HP- $\beta$ -CD ( $n = 4,2$ ).

A eficiência de complexação (EC) foi baixa para todas as CDs testadas, sendo que o maior valor obtido foi para a  $\beta$ -CD (0,0117) e o menor foi para a  $\gamma$ -CD (0,0057).

No ensaio de solubilidade da FLOX com a utilização de ácido cítrico,  $15 \text{ mmol L}^{-1}$  do ácido dissolveu toda a FLOX oferecida ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ). O pH da solução ficou em torno de 5.

O aumento gradativo da concentração de  $\beta$ -CD, na presença de  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido cítrico, não aumentou o grau de solubilização da FLOX.

Embora os valores obtidos para o aumento de solubilidade ( $n$ ) tenham indicado um pequeno aumento da solubilidade da FLOX em relação à concentração oferecida de CDs ( $n/\text{CM}_{\text{CD}}$ ) e os valores da constante de estabilidade ( $K$ ) obtidos, tenham indicado baixa estabilidade dos complexos formados, os experimentos demonstraram que foi possível a formação dos complexos CD/FLOX, aumentando a solubilidade da FLOX em até 4,2 vezes.

As análises de DSC e TGA confirmaram a formação dos complexos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentro do que foi proposto realizar neste trabalho, conclui-se que os principais objetivos foram alcançados, uma vez que o processo de produção de ciclodextrinas, desenvolvido com duas bateladas sequenciadas, na presença de 10 % (v/v) de etanol e com a mesma carga enzimática, atingiu um aumento significativo na produção de CDs. Obteve-se um rendimento, que superou o processo clássico com uma única batelada sem etanol, em 184 e 120 %, respectivamente, usando-se os amidos de milho e mandioca. Este resultado representa um avanço no esforço de desenvolvimento de um processo de produção de ciclodextrinas, que seja mais econômico, considerado o custo relativamente alto da enzima do processo.

Os experimentos realizados com o amido de mandioca, que é produzido em larga escala no noroeste do Paraná, apresentaram rendimentos aproximadamente 30 % maiores do que com o amido de milho, resultado este favorável à região. Embora os experimentos de separação da  $\beta$ -CD por cristalização e precipitação tenham sido ainda de recuperação limitada da  $\beta$ -CD em forma sólida purificada, uma vez que apenas cerca de 50 % do que se produziu foi separado, acredita-se que, pelo aperfeiçoamento desta metodologia de cristalização e recristalização, será possível tornar todo o processo viável, desde a produção até a purificação da  $\beta$ -CD. Por isso, recomenda-se primeiramente o desenvolvimento de projeto de pesquisa para o aprofundamento do estudo da cristalização e purificação da  $\beta$ -CD e, em seguida, um projeto de escalonamento da nova tecnologia de produção de ciclodextrinas, ao nível de uma planta piloto de bancada.

A complexação da enrofloxacin em ciclodextrinas mostrou-se como uma alternativa possível para atenuar os problemas de baixa solubilidade e sabor desagradável deste fármaco. No entanto, quando comparado com valores reportados na literatura para outros medicamentos, o aumento da solubilidade da enrofloxacin, conseguido com as ciclodextrinas testadas, foi ainda relativamente modesto, o que justifica a continuidade do desenvolvimento desta linha de pesquisa, com outros projetos que utilizem derivados das ciclodextrinas, que em função de diferentes grupos protéticos ligados à suas extremidades com hidroxilas primárias ou secundárias, possam levar a constantes de estabilidade do complexo, de muito maior valor e com isso, maior solubilidade do fármaco.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Listamos a seguir algumas sugestões para dar continuidade à pesquisa dos assuntos abordados neste trabalho.

- ✓ Testar o processo de bateladas sequenciadas utilizando a enzima CGTase produzida na UEM, a partir de *Bacillus firmus* nº 37, que é seletiva para a  $\beta$ -CD.
- ✓ Realizar os mesmos experimentos de produção em batelada única e sequenciada, na presença e ausência de etanol, utilizando o amido de arroz, uma vez que ele apresenta maior teor de amilopectina e maior temperatura de gelatinização do que os amidos de milho e de mandioca, o que em princípio aumentaria a produção de CDs.
- ✓ Testar o mesmo processo de produção de ciclodextrinas com microesferas de sagu, que se mantiverem sua integridade física no processo, poderão permitir a separação do amido não reagido por decantação simples em vez de usar centrífugas, e em princípio, reduzir ainda mais o custo operacional do processo.
- ✓ Otimizar os experimentos de cristalização e recristalização da  $\beta$ -CD, variando os parâmetros: concentração da solução, agitação, temperatura e tempo de cristalização, a fim de se recuperar mais  $\beta$ -CD e de forma mais pura.
- ✓ Como a produção de  $\alpha$ -CD foi bastante aumentada na presença de etanol e considerando que o valor agregado a este produto é bem maior do que o da  $\beta$ -CD, seria interessante estudar a melhor alternativa para separação e purificação também da  $\alpha$ -CD produzida.
- ✓ Ampliar a escala do novo processo de produção de ciclodextrinas, ao nível de planta piloto de bancada. Testar o processo de forma integrada.
- ✓ Complexar a enrofloxacin e outros fármacos, com outros derivados das ciclodextrinas, que em função dos radicais ligados à molécula base da CD, possam, via formação de ligações de hidrogênio ou outras ligações, favorecer uma maior estabilidade do complexo e conduzir a maiores constantes de complexação, conseqüentemente, levando a uma solubilidade elevada do princípio ativo.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, L. B. **Síntese da enzima ciclodextrina-glicosiltransferase (CGTase) utilizando *Bacillus firmus***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2002.
- ALVES-PRADO, H. F.; CARNEIRO, A. A. J.; PAVEZZI, F. C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; FRANCO, C. M. L.; da SILVA, R. Production of cyclodextrins by CGTase from *Bacillus clausii* using different starches as substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 146, p. 3-13, 2008.
- ARMBRUSTER, F. C. Method of preparing pure alpha-cyclodextrin. *US Patent 3,541,077*, 1970.
- ARMBRUSTER, F. C.; JACAWAY JR., W. A. Procedure for production of alpha-cyclodextrin. *US Patent 3,640,842*, 1972.
- ARMBRUSTER, F. C. Use of cyclohexane in the production of pure alpha- and beta-cyclodextrins. In: Huber, O.; Szejtli, J. (Eds.) *Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins*, p. 33-39, 1988.
- BALUJA, S.; BHALODIA, R.; BHATT, M.; VEKARIYA, N.; GAJERA, R. Solubility of enrofloxacin sodium in various solvents at various temperatures. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 53, p. 2897-2899, 2008.
- BARÃO, C. E. **Inclusão molecular da oleuropeína e do butil hidroxianisol (BHA) em alfa e beta-ciclodextrina**. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.
- BEESELEY, T. E. Separation and purification of cyclodextrins, *US Patent 5,273,820*, 1993.
- BENDER, H. Studies of the mechanism of the cyclisation reaction catalysed by the wildtype and a truncated  $\alpha$ -cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* strain M 5 al, and the  $\beta$ -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 8. *Carbohydrate Research*, v. 206, p. 257-267, 1990.
- BERGAMASCO, R. C. **Complexação de sulfloramida em ciclodextrina**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.
- BERGAMASCO, R. C. **Encapsulação do aroma vanilina em beta-ciclodextrina e monoclorotriazinil-beta-ciclodextrina fixadas em superfícies celulósicas**. 119 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.
- BERGSMA, J.; BRUINENBERG, P. M.; HOKSE, H.; MEIBERG, J. B. M. Cyclodextrins from potato starch. Recent developments. In: Huber, O.; Szejtli, J. (Eds.) *Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins*, p. 41-46, 1988.
- BERTOLINI, A. C.; CEREDA, M. P.; CHUZEL, G. Fécula e farelo de mandioca como substrato na produção de ciclodextrinas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, n. 2, p. 224-229, 1998.
- BIWER, A.; ANTRANIKIAN, G.; HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, p. 609-617, 2002.

- BLACKWOOD, A. D.; BUCKE, C. Addition of polar organic solvents can improve the product selectivity of cyclodextrin glycosyltransferase - Solvent effects on CGTase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 704-708, 2000.
- BONETTI, P. **Formação do complexo de inclusão entre linalol e ciclodextrinas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p. 248-254, 1976.
- BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 645-666, 2007.
- BUDAL, R. M. **Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas**. 216 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- BUDAVARI, S.; O'NEIL, M. J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P. E.; KINNEARY, J. F. **The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. 12th ed. Whitehouse Station, NJ: Merck & Co., 1996.
- CALSAVARA, L. P. V. **Caracterização da enzima celobiase com modelagem da cinética de hidrólise da celobiose**. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1998.
- CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R. K. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS PharmSciTech*, v. 6, n. 2, p. E329-E357, 2005.
- CHAPLIN, M. Cyclodextrins. *Water Structure and Science*. Disponível em: <<http://www.lsbu.ac.uk/water/cyclodextrin.html>>. Consultado em: 24 jan. 2009.
- CHEN, Y.; LIU, Y. Cyclodextrin-based bioactive supramolecular assemblies. *Chemical Society Reviews*, v. 39, p. 495-505, 2010.
- CHUN, M. K.; CHOI, H. K. Preparation and characterization of enrofloxacin/carbopol complex in aqueous solution. *Archives of Pharmacal Research*, v. 27, n. 6, p. 670-675, 2004.
- CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, v. 28, n.1, p. 1-9, 2007.
- DEGIM, Z.; DEGIM, T.; BAS, L.; ELMAS, M. The use of liposomal enrofloxacin for intracellular infections in Kangal dogs and visualization of phagocytosis of liposomes. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 61, p. 246-251, 2002.
- DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1033-1046, 2004.
- DIXON, M., WEBB, E. C. **Enzymes**, 3rd ed. London: Longman, 1979. Cap. 2 e 4.
- DOMINGUES, M. V. J.; ONISHI, V. C.; BOSSONI, M. T. A.; MORAES, F. F. de. Produção de ciclodextrinas com grânulos de amido em presença de etanol. In: *Anais do VII COBEQ-IC*, São Carlos, v. 1, p. 1-6, 2007.
- ENDO, T.; UEDA, H. Large ring cyclodextrins - Recent progress. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 29, p. 27-38, 2004.

- EVARD, B.; CHIAP, P.; DETULLIO, P.; GHALMI, F.; VAN HEES, T.; CROMMEN, J.; LOSSON, B.; DELATTRE, L. Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from a solution containing hydroxy-propyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Controlled Release*, v. 85, p. 45-50, 2002.
- FRENCH, D. The Sharding dextrins. In: WOLFROM, M. L. (Ed.). **Advances in Carbohydrate Chemistry**. New York: Academic Press, 1957. p. 189-260.
- FRÖMMING, K. H.; SZEJTLI, J. **Cyclodextrins in pharmacy**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, vol. 5, 1994.
- GRILLO, R.; MELO, N. F. S.; FRACETO, L. F. Caracterização físico-química de complexo de inclusão entre hidroximetilnitrofurazona e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. *Química Nova*, v. 31, n. 2, p. 290-295, 2008.
- HAMILTON, L. M.; CATHERINE T.; KELLY, C. T.; FOGARTY, W. M. Review: cyclodextrins and their interaction with amylolytic enzymes. *Enzyme Microbial Technology*, v. 26, p. 561-567, 2000.
- HAMON, V.; MORAES, F. F. de. **Etude Preliminare a L'Immobilisation de L'Enzime CGTase WACKER**. Relatório de Pesquisa – Laboratoire de Technologie Enzymatique, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France, 1990.
- HERMES: Ensaios de cristalização - laboratório de engenharia química II. Disponível em: <hermes.ucs.br/ccet/denq/prof/ana/PLANOSD1.DOC>. Consultado em: 21 dez. 2008.
- HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase-solubility techniques. In: REILLY, C. N. (Ed.). **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**. New York: Wiley, v.4, 1965. p. 117-212.
- HORIKOSHI, K.; NAKAMURA, N. Process for production of cyclodextrin. *US Patent 4,135,977*, 1979.
- HORIKOSHI, K.; YAMAMOTO, M.; NAKAMURA, N.; OKADA, M.; MATSUKAWA, M.; UESHIMA, O.; NAKAKUKI, T. Process for producing cyclodextrins. *European Patent 0,045,464*, 1981a.
- HORIKOSHI, K.; NAKAMURA, N.; MATSUKAWA, M.; YAMAMOTO, M. Industrial production of cyclodextrins. In: *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrins*, Budapeste – Hungria, v. 1, p. 25-39, 1981b.
- IN VITRO DIAGNÓSTICA: Manual de Produtos e Métodos, p. 54. Disponível em: <[http://www.invitro.com.br/principal/manuais/Produtos\\_Metodos.pdf](http://www.invitro.com.br/principal/manuais/Produtos_Metodos.pdf)>. Consultado em: 14 out. 2010.
- KATO, T.; HORIKOSHI, K. A new  $\gamma$ -cyclodextrin forming enzyme produced by *Bacillus subtilis* no. 313. *Journal of the Japanese Society of Starch Science*, v. 33, p. 137-143, 1986.
- KELLY, R. M.; DIJKHUIZEN, L.; LEEMHUIS, H. The evolution of cyclodextrin glucanotransferase product specificity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 84, p. 119-133, 2009.
- KIM, Y. H.; BAE, K. H.; KIM, T. J.; PARK, K. H.; LEE, H. S.; BYUN, S. M. Effect on product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry and Molecular Biology International*, v. 41, n. 2, p. 227-234, 1997.
- KIM, T. J.; KIM, B. C., LEE, H. S. Production of cyclodextrins using moderately heat-treated cornstarch. *Enzyme Microbial Technology*, v. 17, p. 1057-1061, 1995.

- KIM, T. J.; KIM, B. C., LEE, H. S. Production of cyclodextrins using raw corn starch without a pretreatment. *Enzyme Microbial Technology*, v. 20, p. 506-509, 1997.
- KINALEKAR, M. S.; KULKARNI, S. R.; VAVIA, P. R. Simultaneous determination of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  cyclodextrins by LC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 22, p. 661-666, 2000.
- KITAHATA, S.; OKADA, S. Comparison of action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. Stearothermophilus* and *B. macerans*. *Journal of the Japanese Society of Starch Science*, v. 29, p. 13-18, 1982.
- KLEIN, C.; HOLLENDER, J.; BENDER, H.; SCHULZ, G. E. Catalytic center of cyclodextrin glycosyltransferase derived from X-ray structure analysis combined with site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, v. 31, p. 8740-8746, 1992.
- KOHL, M.; PUEL, F.; KLEIN, J. P.; HOFF, C.; MONNIER, O. Investigation of the growth rate of  $\beta$ -cyclodextrin in water during both flow-cell and batch experiments. *Journal of Crystal Growth*, v. 270, p. 633-645, 2004.
- KORPELA, T.; LAAKO, S.; MAKELA, M. Process for isolation and purification of cyclodextrins. *US Patent 4,897,472*, 1990.
- LEE, J. H.; CHOI, K. H.; CHOI, J. Y.; LEE, Y. S.; KWON, I. B.; YU, J. H. Enzymatic production of  $\alpha$ -cyclodextrin with the cyclomaltodextrin glucanotransferase of *Klebsiella oxytoca* 19-1. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 14, p. 1017-1020, 1992.
- LEE, Y.-D.; KIM, H.-S. Effect of organic solvents on enzymatic production of cyclodextrins from unliquefied corn starch in an attrition bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 39, n. 10, p. 977-98, 1992.
- LI, Z.; WANG, M.; WANG, F.; GU, Z.; DU, G.; WU, J.; CHEN, J.  $\gamma$ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 77, p. 245-255, 2007.
- LIMA, H. O. S. **Produção de beta-ciclodextrina por fermentação e ciclização simultâneas**. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1996.
- LIMA, H. O. S.; MORAES, F. F. de; ZANIN, G. M.  $\beta$ -Cyclodextrin production by simultaneous fermentation and cyclization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 70-72, p. 789-804, 1998.
- LINDE, G. A. **Caracterização de complexos de inclusão entre ciclodextrinas e aminoácidos envolvidos no sabor amargo**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.
- LIZONDO, M.; PONS, M.; GALLARDO, M.; ESTELRICH, J. Physicochemical properties of enrofloxacin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 15, p. 1845-1849, 1997.
- LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 329, p. 1-11, 2007.
- LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. The complexation efficiency. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 57, p. 545-552, 2007.
- LOFTSSON, T.; JARHO, P.; MÁSSON, M.; JÄRVINEN, T. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 2, p. 335-351, 2005.



MAHENDRAN, K. R.; ERIC HAJJAR, E.; MACH, T.; LOVELLE, M.; KUMAR, A.; SOUSA, I.; SPIGA, E.; WEINGART, H.; GAMEIRO, P.; WINTERHALTER, M.; CECCARELLI, M. Molecular basis of enrofloxacin translocation through ompf, an outer membrane channel of *Escherichia coli* - when binding does not imply translocation. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 114(15), p. 5170-5179, 2010.

MÄKELLÄ, M.; MATTSSON, P.; KORPELA, T. Specific adsorbents in isolation and purification of cyclodextrins. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.11, p. 193-200, 1989.

MARQUES, M. B. A. **Produção da enzima ciclodextrina-glicosil-transferase em diferentes meios de cultivo utilizando o *Bacillus firmus* alcalofílico - cepa 37.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

MATIOLI, G. **Seleção de microrganismo e caracterização de sua enzima ciclodextrina glicosiltransferase.** 1997. 240 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 1997.

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

MATTSSON, P.; KORPELA, T.; PAAVILAINEN, S.; MÄKELLÄ, M.; Enhanced conversion of starch to cyclodextrins in ethanolic solutions by *Bacillus circulans* var *alkalophilus* cyclomaltodextrin glucanotransferase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 30, p. 17-28, 1991.

MATTSSON, P.; MÄKELLÄ, M.; KORPELA, T. Isolation and purification of gamma-cyclodextrin by affinity chromatography. In: *Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins*, p. 65-70, 1988.

MELO, N. F. S.; GRILLO, R.; MORAES, C. M.; BRITO, C. L.; TROSSINI, G. H. G.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, n. 1, p. 35-44, 2007.

MENDONÇA, R. A. G. **Cristalização do clorato de sódio.** 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.

MORI, S.; GOTO, M.; MASE, T.; MATSUURA, A.; OYA, T.; KITAHATA, S. Reaction conditions for the production of  $\gamma$ -cyclodextrin by cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium sp.* No. 9605. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 59, n.6, p. 1012-1015, 1995.

MORIWAKI, C.; COSTA, G. de L.; FERRACINE, C. N.; MORAES, F. F. de; ZANIN, G. M.; PINEDA, E. A. G.; MATIOLI, G. Solubility enhancement of albendazole by complexation with  $\beta$ -cyclodextrin. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 25, p. 255-267, 2008.

MORIWAKI, C.; MAZZER, C.; PAZZETTO, R.; MATIOLI, G. Produção, purificação e aumento da performance de ciclodextrina glicosiltransferases para produção de ciclodextrinas. *Química Nova*, v. 15, p. 1-7, 2009.

- NAKAGAWA, T.; UENO, K.; KASHIWA, M.; WATANABE, J. The stereoselective synthesis of cyclomaltoheptaose. A novel cyclodextrin homologue with D.P. five. *Tetrahedron Letters*, v. 35, n. 12, p. 1921-1924, 1994.
- NORMAN, B. E.; JORGENSEN, T. *Thermoanaerobacter* sp. CGTase: its properties and application. *Denpun Kagaku*, v. 39, n.2, p. 101-108, 1992.
- OKADA, M.; MATSUZAWA, M.; UEZIMA, O. Process for producing cyclodextrins. *US Patent 4,384,898*, 1983a.
- OKADA, M.; MATSUZAWA, M.; UEZIMA, O.; NAKAKUKI, T.; HORIKOSHI, K. Process for producing gamma-cyclodextrins. *US Patent 4,418,144*, 1983b.
- OKADA, S.; TSUYAMA, N. Method of converting starch to  $\beta$ -cyclodextrin. *US Patent 3,812,011*, 1974.
- OLIVEIRA, G. **Estudos cinéticos da enzima ciclodextrina-glicosil-transferase obtida de *Bacillus* sp (cepa 43)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2000.
- OLIVEIRA, R.; SANTOS, D. COELHO, P. Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. ISSN 1646-0480.6, p. 70-83, 2009
- PINTO, M. P. **Optimização dos processos de produção de xaropes de glucose e dextrose monohidratada**. 40 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) - Instituto Superior Técnico – Universidade Técnica de Lisboa, 2009. Disponível em: <<https://dspace.ist.utl.pt/bitstream/2295/572502/1/dissertacao.pdf>>. Consultado em: 14 out. 2010.
- PISHTIYSKI, I.; ZHEKOVA, B. Effect of different substrates and their preliminary treatment on cyclodextrin production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 22, p. 109-114, 2006.
- QI, Z. H.; HEDGES, A.; SANCHES, E. Purification of chemically modified cyclodextrins. *US Patent 5569756*, 1996.
- QI, Q.; ZIMMERMANN, W. Cyclodextrin Glucanotransferase: from gene to applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, p. 475-485, 2005.
- QI, Q.; MOKHTAR, M. N.; ZIMMERMANN, W. Effect of ethanol on the synthesis of large-ring cyclodextrins by cyclodextrin glucanotransferases. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 57, p. 95-99, 2007.
- RAUF, Z. A.; ILIAS, R. M.; MAHADI, N. M., HASSAN, O. Experimental design to optimization of beta cyclodextrin production from ungelatinized sago starch. *European Food Research and Technology* v. 226, p. 1421–1427, 2008.
- ROQUETTE-PHARMA, Kleptose betacyclodextrins and HPBCD. Disponível em: <<http://www.roquette-pharma.com/argosSites/pharma-en/brochures/02/visio.html>>. Consultado em: 20 outubro 2010.
- SÁ BARRETO, L. C. L.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Ciclodextrina: importante excipiente farmacêutico funcional. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.27, n. 4, p. 629-636, 2008.
- SAKINAH, A. M. M.; ISMAIL, A. F.; ILLIAS, R. M.; ZULARISAM, A. W.; HASSAN, O.; MATSUURA, T. Cyclodextrin production in hollow fiber membrane reactor system: Effect of substrate preparation. *Separation and Purification Technology*, v. 63, p. 163-171, 2008.

- SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 37, n. 1, p. 1-8, 2001.
- SEEDHER, N.; AGARWAL, P. Various solvent systems for solubility enhancement of enrofloxacin. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 71, p. 82-87, 2009.
- SILVA, D. J. **Produção de maltodextrina com baixo teor de glicose**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1998.
- SILVA, F. C. As Ciclodextrinas como base de excipientes farmacêuticos. *Portal dos fármacos*. Disponível em : [http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/resenhas\\_ciclodextrinas.html](http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/resenhas_ciclodextrinas.html)>. Consultado em: 21 dez. 2008.
- SLOMINSKA, L.; SZOSTEK, A.; GRZESKOWIAK, A. Studies on enzymatic continuous production of cyclodextrins in an ultrafiltration membrane bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, v. 50, p. 423-428, 2002.
- SOBRAL, K. C. A. **Imobilização da enzima ciclodextrina-glicosil-transferase em alumina, sílica de porosidade controlada e quitosana**. 182 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2002.
- SOUZA, M.; FARIA, S. H. B.; ZANIN, G. M.; MORAES, F.F. Modelagem cinética da produção simultânea de  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrinas. In: COBEQ – XVIII – CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2010, Foz do Iguaçu, Anais, p. 1708-1715. 1 CD-ROM.
- SOUZA, M. **Modelagem cinética da produção de ciclodextrinas**. 145 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.
- SOPHIANOPOULOS, A. J.; WARNER, I. M. Purification of  $\beta$ -cyclodextrin. *Analytical Chemistry*, v. 64, p. 2652-2654, 1992.
- STELLA, V. J.; HE, Q. Cyclodextrins. *Toxicologic Pathology*, v. 36, p. 30-42, 2008.
- SWINKELS, J. J. M. Sources of starch, its chemistry and physics. In: VAN BEYNUM, G. M. A.; ROELS, J. A. **Starch conversion technology**. New York: Marcel Dekker, 1985. p. 15-45.
- SZEJTLI, J. Cyclodextrin technology. In: DAVIES, J. E. D. (Ed.). **Topics in inclusion science**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 79-185.
- SZEJTLI, J. The cyclodextrins and their applications in biotechnology. *Carbohydrate Polymers*, v. 12, p. 375-392, 1990.
- SZEJTLI, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure and Applied Chemistry*, v.76, n. 10, p. 1825-1845, 2004.
- SZEJTLI, J. Cyclodextrin complexed generic drugs are generally not bio-equivalent with the reference products: therefore the increase in number of marketed drug/cyclodextrin formulations is so slow. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 52, p. 1-11, 2005.
- SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, v.15, p. 137-142, 2004.

TARDIOLI, P. W. **Produção de ciclodextrinas em reator de leito fluidizado com a enzima ciclodextrina glicosiltransferase imobilizada**. 166 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1998.

TARDIOLI, P. W. **Imobilização multipontual de CGTase em suportes glioxil-agarose e glioxil-sílica**. Relatório de Pesquisa – Processo CNPq-150633/2003-3 – Pós-Doutorado Departamento de Engenharia Química – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

TARDIOLI, P. W.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. de. Characterization of *Thermoanaerobacter* cyclomaltodextrinoglucanotransferase immobilized on glyoxyl-agarose. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 1270-1278, 2006.

THOMAS, D. J.; ATWELL, W. A. **Starches: practical guides for the food industry**. Eagan Press Hand Book Series. St Paul, Minnesota: Eagan Press, 1999. Chapter 4, 94 p.

TIWARI, G.; TIWARI, R.; RAI, A. K. Cyclodextrins in delivery systems : applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, v. 2, p. 72-78, 2010.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*, v.6, p. 24-27, 1969.

TSUCHIYAMA, Y; YAMAMOTO, K-I.; ASOU, T.; OKABE, M.; YAGI, Y.; OKAMOTO, R. A Novel process of cyclodextrin production by the use of specific adsorbents: Part I. screening of specific adsorbents. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 71 n. 6, p. 407-412, 1991.

UITDEHAAG, J. C. M.; van ALEBEEK, G-J. W. M.; van der VEEN, B. A.; DIJKHUIZEN, L.; DIJKSTRA, B. W. Structures of maltohexaose and maltoheptaose bound at the donor sites of cyclodextrin glycosyltransferase give insight into the mechanisms of transglycosylation activity and cyclodextrin size specificity. *Biochemistry*, v. 39, p. 7772-7780, 2000.

VALGAS, S. **Desenvolvimento de um novo sistema de liberação controlada do fármaco enrofloxacina a partir de microesferas de malonilquitosana a ser aplicado em medicina veterinária**. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

VALGAS, S.; GONÇALVES, V. L.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T.; PEDROSA, R. C. Malonylchitosan microspheres as a matrix for oral enrofloxacin delivery. *Macromolecular Symposia*, v. 229, p. 246-252, 2005.

van de MANAKKER, F.; VERMONDEN, T.; van NOSTRUM, C. F.; HENNINK, W. E. Cyclodextrin-based polymeric materials: synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications. *Biomacromolecules*, v. 10, n. 12, p. 3157-3175, 2009.

van der VEEN, B. A.; UITDEHAAG, J. C. M.; DIJKSTRA, B. W.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1543, p. 336-360, 2000.

Varredura diferencial de calorimetria [http://pt.wikipedia.org/wiki/Varredura\\_diferencial\\_de\\_calorimetria](http://pt.wikipedia.org/wiki/Varredura_diferencial_de_calorimetria), Consultado em 2011

VIKMON, M., Rapid and simple spectrophotometric method for determination of microamounts of cyclodextrins. In: SZEJTLI, J. (Ed.). *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*. Dordrecht: D. Ridel Publishing Company, 1981. p. 69-74.

WATANABE, S. N. **Determinação da constante de complexação da glicirrizina com gama-ciclodextrina**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

YAGI, Y.; SATO, M.; ISHIKURA, T. Comparative studies of CGTases from *Bacillus ohbensis*, *Bacillus macerans* and *Bacillus circulans* and production of cyclodextrin using those CGTases. *Journal of the Japanese Society of Starch Science*, v. 33, p. 144-151, 1986.

ZANIN, G. M. **Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada**. 499 f. Tese (Doutorado) – UNICAMP, Campinas, 1989.

ZHEKOVA, B.; DOBREV, G.; STANCHEV, V.; PISHTIYSK, I. Approaches for yield increase of  $\beta$ -cyclodextrin formed by cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, p. 1043-1049, 2009.

## PUBLICAÇÕES E APRESENTAÇÕES EM EVENTOS

Artigo: *Production of cyclodextrins from cornstarch granules in a sequential batch mode and in the presence of ethanol*, submetido para publicação na revista *Enzyme and Microbial Technology*.

A seguir apresenta-se a relação dos trabalhos que foram apresentados em eventos da área, bem como aqueles publicados em Anais de Congressos.

1. CALSAVARA, L. P. V.; BALBINO, T. A.; FERRARI, H. S.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Produção de ciclodextrinas em bateladas sequenciadas na presença de etanol. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Foz do Iguaçu, 19-22 de setembro, 2010.
2. CALSAVARA, L. P. V.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Produção de complexos de inclusão da enrofloxacin com ciclodextrinas. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Foz do Iguaçu, 19-22 de setembro, 2010.
3. CALSAVARA, L. P. V.; CUNHA, A. R. D.; BALBINO, T. A.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Produção de ciclodextrinas a partir do amido de milho por catálise enzimática em bateladas sequenciadas em presença do etanol. Anais do 15<sup>th</sup> Brazilian Congress on Catalysis – 5<sup>th</sup> Mercosur Congress on Catalysis, Armação de Buzios, RJ, 13 a 17 de setembro de 2009.
4. CALSAVARA, L. P. V.; CUNHA, A. R. D.; BALBINO, T. A.; FERRARI, H. S.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Produção de ciclodextrinas a partir do amido de milho na presença de etanol. Anais do IX Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Maringá, 23 a 27 de novembro, 2009.
5. CALSAVARA, L. P. V.; CUNHA, A. R. D.; BALBINO, T. A.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Sequential batch production of cyclodextrins in the presence of ethanol. Program and Abstracts 31<sup>st</sup> Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, San Francisco, CAL, USA, May 3-6, 2009.
6. CALSAVARA, L. P. V.; SEREZA, T. W.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. de. Complexation of Enrofloxacin with Cyclodextrins, apresentado no 14th International Cyclodextrins Symposium em Kyoto, Japão, em maio de 2008.
7. FERRARI, H. S.; CALSAVARA, L. P. V.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Produção e separação da beta-ciclodextrina obtida a partir da fécula de mandioca na presença de etanol. Anais do XIX Encontro Anual de Iniciação Científica, Guarapuava, 20 a 30 de outubro, 2010 .
8. BALBINO, T. A.; CALSAVARA, L. P. V.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Produção, separação e purificação de beta-ciclodextrina a partir do amido de

milho. Anais do XVIII Encontro Anual de Iniciação Científica, Londrina, 30 de setembro a 2 de outubro, 2009.

9. BALBINO, T. A.; FERRARI, H. S.; CALSAVARA, L. P. V.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Produção de beta-ciclodextrina a partir do amido de milho e de mandioca. III Simpósio de Engenharia Química, Maringá, 25-29 de maio, 2009.
10. BALBINO, T. A.; FERRARI, H. S.; CALSAVARA, L. P. V.; ZANIN, G. M. Produção, separação e purificação de beta-ciclodextrina, utilizando como substrato o amido de milho. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica (COBEQ-IC), Uberlandia, 25 a 30 de julho, 2009.
11. CUNHA, A. R. D.; CALSAVARA, L. P. V.; DOMINGUES, M. V. J.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Produção de  $\beta$ -ciclodextrina com a enzima Toruzyme a partir do amido de milho. Anais do VIII Encontro Regional de Catálise, ERCat 2008/ GRCat 2008 / SBCat, Paulinia, 16-17 de maio, 2008.
12. CUNHA, A. R. D.; CALSAVARA, L. P. V.; DOMINGUES, M. V. J.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Produção de  $\beta$ -ciclodextrina com a enzima Toruzyme a partir do amido de milho. II Simpósio de Engenharia Química, Maringá, 26-30 de maio, 2008.
13. CUNHA, A. R. D.; CALSAVARA, L. P. V.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Produção de  $\beta$ -ciclodextrina em presença de etanol a partir do amido de milho em batelada seqüenciada. Anais do XVII Encontro Anual de Iniciação Científica, Foz do Iguaçu, 19 a 22 de novembro, 2008.