

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS EM REATOR DE LEITO FLUIDIZADO  
COM A ENZIMA CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE IMOBILIZADA**

Paulo Waldir Tardioli

Eng<sup>o</sup> Químico, UEM, 1995

Orientador: Prof. Flávio Faria de Moraes, Ph.D.

Dissertação de Mestrado  
submetida à Universidade  
Estadual de Maringá, como parte  
dos requisitos necessários à  
obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Química, área de  
Desenvolvimento de Processos.

Maringá – PR – Brasil

Dezembro de 1998

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Dissertação de Mestrado apresentada por Paulo Waldir Tardioli perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 15 de Dezembro de 1998.

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Flávio Faria de Moraes, Ph.D.

Orientador



Profª Gisella Maria Zanin, Dr. Eng.

Membro



Profª Raquel de Lima Camargo Giordano, Dr. Ing.

Membro

TARDIOLI, PAULO WALDIR

Produção de Ciclodextrinas em Reator de Leito Fluidizado com a Enzima Ciclodextrina Glicosiltransferase Imobilizada [Paraná] 1998

XXV, 169 p. 29,7 cm (PEQ/UEM, M.Sc., Engenharia Química, 1998)

Dissertação – Universidade Estadual de Maringá-PEQ

1 – Ciclodextrinas

2 – Ciclodextrina Glicosiltransferase

3 – CGTase Imobilizada

I. PEQ/UEM II. Título (série)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS por sua infinita bondade.

Aos meus pais, pelo apoio, dedicação, compreensão e principalmente pelo amor que me têm dado em todos os dias da minha existência.

Ao professor Flávio Faria de Moraes, pela orientação deste trabalho e por compartilhar de seu conhecimento, contribuindo para o meu aperfeiçoamento acadêmico.

À professora Gisella Maria Zanin, por todo o apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Engenharia Química pela contribuição para o meu desenvolvimento profissional.

Ao Departamento de Farmácia, em especial à professora Graciete Matioli.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade da empresa Herbitécnica.

Aos engenheiros Lauro Mitsuaki Kambara e Luiza Pedrina Vilxenski Calssavara, pelo apoio técnico no desenvolvimento experimental desta dissertação.

Aos técnicos Donizete A. Frota, Fernando F. Queiroz e Sebastião P. Guerra pelo auxílio na montagem do módulo experimental.

À analista de sistema Sueleni Mendez Batista, por seu apoio técnico

Aos profissionais Edival de Oliveira, Maria Sueli Borghi Peron e Marilza Sadako Kuabara Nery, que indiretamente contribuíram para a conclusão de mais uma etapa da minha vida profissional.

Aos meus amigos Alessandra, Alexandre, Ana Cláudia, Ana Luiza, Angélica, Douglas, Elenice, Fábio, Fernanda, Larissa, Marcelo, Maria Angélica, Maria Beatriz, Mauro, Ricardo, Silvânia e Vandrê, por todos os momentos bons que passamos juntos.

Ao mestrando Alexandre Santa Barbara Azevedo, pela colaboração na realização de uma das etapas do meu trabalho experimental.

À CAPES pela concessão da bolsa que foi de suma importância para a realização desta pesquisa.

Ao CNPq e ao PADCT-II pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**A todos o meu muito obrigado.**

# PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS EM REATOR DE LEITO FLUIDIZADO COM A ENZIMA CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE IMOBILIZADA

**AUTOR: PAULO WALDIR TARDIOLI**

**ORIENTADOR: FLÁVIO FARIA DE MORAES, Ph.D.**

Dissertação de Mestrado; 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 15 de dezembro de 1998.

## RESUMO

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, formados por um número variável de unidades de glicose, unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha - 1,4$ . As mais comuns são constituídas de 6, 7 e 8 unidades de glicose, sendo denominadas  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, respectivamente. São produzidas pela ação da enzima Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase) sobre o amido previamente liqüefeito. Pelo fato de terem uma cavidade apolar, que favorece a microencapsulação de uma grande variedade de moléculas orgânicas, apresentam diversas aplicações nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, de cosméticos, entre outras. Neste trabalho, o objetivo principal foi estudar a produção de CDs em reator de leito fluidizado, em função do tempo de residência do substrato no leito de partículas, utilizando a CGTase imobilizada em sílica de porosidade controlada (SPC), com diâmetro médio de partículas da ordem de 0,42 mm.

A CGTase originária do *Bacillus alcalofílico* sp. e clonada em *Escherichia coli*, foi fornecida pela WACKER, contendo 193,1 mg de proteína/g de enzima liofilizada e atividade específica de 63,1  $\mu$ moles de  $\beta$ -CD/(min. mg de proteína), determinada a 50°C e pH 8. A enzima foi purificada por cromatografia de afinidade bioespecífica, utilizando como suporte a Sepharose 6B e como ligante a  $\beta$ -CD. Em seguida a CGTase foi imobilizada em SPC pelo método da ligação covalente, utilizando-se glutaraldeído como reagente bifuncional.

A purificação apresentou fator um de purificação igual a 1,2 e um rendimento em atividade de 72%. Do total de proteína submetida à purificação, 94% foi recuperada,

sendo que deste total 65,3% correspondia à enzima CGTase. Obteve-se uma solução enzimática contendo 1,64 mg de proteína/mL de solução e atividade específica de 73,80  $\mu$ moles de  $\beta$ -CD/(min. mg de proteína).

Na imobilização da CGTase, o rendimento de fixação de proteína foi igual a 28,96 %, produzindo uma enzima imobilizada com 4,66 mg de proteína/g de suporte seco e uma atividade de 8,62  $\mu$ moles de  $\beta$ -CD/(min. g<sub>EI</sub>), o que corresponde a um rendimento em atividade de 2,53%. A recuperação da atividade total oferecida à imobilização foi igual a 28,68%.

A produção de CDs foi conduzida a 50°C, variando-se a carga enzimática no reator e mantendo-se fixa a porosidade do leito fluidizado líquido-sólido em 0,5. O substrato utilizado foi uma solução de dextrina 10 (FLUKA) 100 g/L, contendo tampão tris-HCl, pH 8, 0,01 M e solução de cloreto de cálcio 5 mM. As amostras foram coletadas no efluente do reator e as concentrações de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD foram determinadas pelos métodos colorimétricos da fenolftaleína e do verde de bromocresol.

A conversão máxima de dextrina em CDs, no reator de leito fluidizado com a CGTase imobilizada foi da ordem de 17%, com um tempo de residência de aproximadamente 13 minutos. A produção de  $\beta$ -CD foi aproximadamente 4 vezes superior à de  $\gamma$ -CD, comprovando que esta enzima trata-se de uma  $\beta$ -CGTase. A produção máxima de  $\beta$ -CD foi igual a 11 mM, representando 80% do total de CDs produzidas. Com um tempo de residência de aproximadamente 4 minutos, a produção de CDs ( $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD) ficou em torno de 15% (10,4 mM de  $\beta$ -CD e 2,3 mM de  $\gamma$ -CD). Com a utilização da CGTase livre, o tempo para se obter praticamente a mesma produção de CDs ( 10,0 mM de  $\beta$ -CD e 2,5 mM de  $\gamma$ -CD ) é normalmente de 24 horas. Este resultado demonstra a superioridade do leito fluidizado com enzima imobilizada para produzir ciclodextrinas.

**PRODUCTION OF CYCLODEXTRINS IN A FLUIDIZED BED REACTOR WITH THE  
IMMOBILIZED ENZYME CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE**

**AUTHOR: PAULO WALDIR TARDIOLI**

**SUPERVISOR: FLÁVIO FARIA DE MORAES, Ph.D.**

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; State University of Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46-09; ZIP CODE: 87020-900-Maringá-PR, Brazil, presented on December 15, 1998.

**ABSTRACT**

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides, formed by a variable number of glucose units, linked to each other by  $\alpha$  - 1,4-linkages. The most common are constituted by 6, 7 and 8 glucose units and are denominated  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD and  $\gamma$ -CD, respectively. They are produced by the action of the enzyme Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) on the starch previously liquefied. Owing to the fact that CDs have an apolar cavity, which favors the encapsulation of a great variety of organic molecules, they have countless applications in the pharmaceutical, food and cosmetics industries, among others. In this work, the main objective was to study the production of CDs in a fluidized bed reactor, as a function of the residence time of the substrate in the bed of particles. CGTase was immobilized into controlled-pore silica (CPS) particles having a mean diameter of the order of 0.42 mm.

CGTase originally from *Bacillus alkalophilic* sp., and cloned in *Escherichia coli*, was supplied by WACKER, with 193.1 mg of protein/g of lyophilized enzyme and specific activity of 63.1  $\mu$ mol of  $\beta$ -CD/(min.mg of protein), determined at 50°C and pH 8. The enzyme was purified by biospecific affinity chromatography, using Sepharose 6B as support and  $\beta$ -CD as the immobilized ligand. Afterwards, CGTase was immobilized into CPS by covalent bonding, using the silane-glutaraldehyde method.

The purification showed a purification factor of 1.2 with an activity recovery of 72%. From the total protein submitted to purification, 94% was recovered, and 65.3% of this total corresponded to the enzyme CGTase. An enzymatic solution with 1.64 mg of

protein/mL of solution was obtained with a specific activity of 73.80  $\mu\text{mol}$ s of  $\beta\text{-CD}/(\text{min}\cdot\text{mg}$  of protein ).

In the immobilization of CGTase, the yield of protein fixation was 28.96 %, producing an immobilized enzyme with 4.66 mg of protein/g of dry support and an activity of 8.62  $\mu\text{mol}$ s of  $\beta\text{-CD}/(\text{min}\cdot\text{g}_{\text{EI}})$ , which corresponds to an activity yield of 2,53%. The recovery of the total activity offered to immobilization was 28.68%.

The production of CDs was made at 50°C, varying the immobilized enzyme load inside the reactor and fixing the porosity of the liquid-solid fluidized bed at 0.5. The substrate used was a solution of dextrin 10 (FLUKA) 100 g/L, with tris-HCl buffer, pH 8, 0.01 M and calcium chloride 5 mM. Samples were collected at the effluent of the reactor and the concentrations of  $\beta\text{-CD}$  and  $\gamma\text{-CD}$  were determined by colorimetric methods using the dyes phenolphthalein and Bromocresol green, respectively.

The maximum conversion of the dextrin to CDs, in the fluidized bed reactor, with immobilized CGTase, was about 17%, in which case the residence time was approximately 13 minutes. The production of  $\beta\text{-CD}$  was approximately four times superior to that of  $\gamma\text{-CD}$ , showing that this enzyme is a  $\beta\text{-CGTase}$ . The maximum production of  $\beta\text{-CD}$  was 11 mM, representing 80% of the total CD produced. With a residence time of approximately 4 minutes, the production of CDs ( $\beta\text{-CD}$  and  $\gamma\text{-CD}$ ) was around 15% (10.4 mM of  $\beta\text{-CD}$  and 2.3 mM of  $\gamma\text{-CD}$ ). Using a free CGTase, the time necessary to obtain practically the same production of CDs (10.0 mM of  $\beta\text{-CD}$  and 2.5 mM of  $\gamma\text{-CD}$ ) is normally 24 hours. This result demonstrates the superior quality of the fluidized bed reactor with immobilized enzyme to produce cyclodextrins.

## ÍNDICE DO TEXTO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	03
2.1 – CICLODEXTRINAS.....	03
2.1.1 – <i>Histórico das Ciclodextrinas</i> .....	04
2.1.2 – <i>Estrutura e Características Físico-químicas das Ciclodextrinas</i> .....	06
2.1.3 – <i>Complexos de Inclusão: Propriedades e Preparação</i> .....	12
2.1.4 – <i>Derivados de Ciclodextrinas</i> .....	16
2.1.5 – <i>Metabolismo e Toxicidade das Ciclodextrinas</i> .....	18
2.1.6 – <i>Aplicações das Ciclodextrinas</i> .....	20
2.1.6.1 – <i>Aplicações na Indústria Farmacêutica</i> .....	21
2.1.6.2 – <i>Aplicações na Indústria Alimentícia</i> .....	22
2.1.6.3 – <i>Aplicações em Cosméticos</i> .....	23
2.1.6.4 – <i>Aplicações em Produtos Agrícolas</i> .....	24
2.1.6.5 – <i>Aplicações em Biotecnologia</i> .....	24
2.2 – ENZIMA CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE.....	25
2.2.1 – <i>Origem e Produção da Enzima CGTase</i> .....	26
2.2.2 – <i>Mecanismo de Ação e Estrutura Molecular da CGTase</i> .....	30
2.2.3 – <i>Purificação da Enzima CGTase</i> .....	33
2.3 – IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	36
2.3.1 – <i>Métodos de Imobilização de Enzimas</i> .....	38
2.3.2 – <i>Suportes para a Imobilização de Enzimas</i> .....	38
2.3.3 – <i>Seleção do Suporte e do Método para a Imobilização de Enzimas</i> ..	41
2.3.3.1 – <i>Suporte</i> .....	41
2.3.3.2 – <i>Método</i> .....	41
2.3.4 – <i>Método da Ligação Covalente</i> .....	42
2.4 – REATORES PARA ENZIMAS IMOBILIZADAS.....	44

2.4.1 – Reator de Leito Fluidizado.....	45
2.4.2 – Fluidização Líquido-Sólido.....	46
2.4.2.1 – Desvios da Idealidade.....	47
2.4.2.2 – Expansão do Leito.....	47
2.4.2.3 – Velocidade Mínima de Fluidização.....	49
2.5 – PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS.....	50
2.5.1 – Produção de <b>b</b> -CD.....	54
2.5.2 – Produção de <b>a</b> -CD.....	55
2.5.3 – Produção de <b>g</b> CD.....	56
2.6 – IMOBILIZAÇÃO DA CGTase E SUA UTILIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS.....	56
<b>3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
3.1 – MATERIAIS.....	61
3.1.1 – Substrato.....	61
3.1.2 – Enzima.....	61
3.1.3 – Ciclodextrinas Padrões.....	61
3.1.4 – Reagentes Analíticos.....	62
3.1.5 – Suportes.....	62
3.1.6 – Reatores e Equipamentos.....	62
3.1.6.1 – Reatores.....	62
3.1.6.1.1 – Reator batelada Tipo Cesta ( basket ).....	62
3.1.6.1.2 – Reator de Leito Fluidizado.....	63
3.1.6.2 – Equipamentos.....	64
3.2 – MÉTODOS.....	65
3.2.1 – Dosagem de Ciclodextrinas.....	65
3.2.1.1 – Dosagem de <b>b</b> -Ciclodextrina.....	66
3.2.1.1.1 – Interferência da <b>g</b> CD na Dosagem de <b>b</b> -CD.....	67
3.2.1.1.2 – Interferência da dextrina na Dosagem de <b>b</b> -CD..	68

3.2.1.2 – Dosagem de $\beta$ CD.....	68
3.2.2 – Dosagem de Proteínas.....	68
3.2.2.1 – Interferência de CDs na Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford.....	69
3.2.3 – Caracterização da Sílica de Porosidade Controlada (SPC).....	69
3.2.3.1 – Diâmetro Médio das Partículas ( $d_p$ ).....	70
3.2.3.2 – Densidade Cristalina ( $r_s$ ).....	70
3.2.3.3 – Porosidade Interna da Partícula ( $e_p$ ).....	71
3.2.3.4 – Densidade da Partícula Seca ( $r_p$ ).....	72
3.2.4 – Expansão do Leito de Partículas.....	72
3.2.5 – Determinação do Teor de Proteína da Enzima Liofilizada (CGTase WACKER).....	73
3.2.6 – Determinação da Atividade Enzimática.....	73
3.2.6.1 – Atividade da CGTase Livre.....	74
3.2.6.2 – Atividade da CGTase Imobilizada.....	75
3.2.7 – Purificação da CGTase WACKER.....	76
3.2.7.1 – Preparação do Suporte Cromatográfico ( $\beta$ CD-Sepharose).....	76
3.2.7.1.1 – Ativação do Gel de Agarose.....	77
3.2.7.1.2 – Imobilização do Ligante $\beta$ -CD.....	77
3.2.7.2 – Processo Cromatográfico.....	77
3.2.8 – Imobilização da CGTase Purificada.....	80
3.2.8.1 – Hidratação do Suporte.....	80
3.2.8.2 – Silanização do Suporte.....	80
3.2.8.3 – Ativação do Suporte.....	81
3.2.8.4 – Imobilização da Enzima CGTase Purificada.....	82
3.2.9 – Produção de Ciclodextrinas em Reator de Leito Fluidizado com a Enzima CGTase Imobilizada.....	83
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>85</b>
4.1 – CURVAS PADRÕES DE DOSAGEM DE CICLODEXTRINAS E PROTEÍNAS.....	85

4.1.1 – Curva Padrão para Dosagem de <b>b</b> -Ciclodextrina.....	85
4.1.1.1 – Interferência da <b>g</b> CD na Dosagem de <b>b</b> -CD.....	87
4.1.1.2 – Interferência da Dextrina na Dosagem da <b>b</b> -CD.....	89
4.1.2 – Curva Padrão para Dosagem de <b>g</b> CD.....	90
4.1.3 – Curva Padrão para a Dosagem de Proteínas.....	92
4.1.3.1 – Interferência de CDs na Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford.....	93
4.2 – CARACTERIZAÇÃO DA SÍLICA DE POROSIDADE CONTROLADA.....	95
4.2.1 – Diâmetro Médio das Partículas.....	95
4.2.2 – Densidade Cristalina ( $r_s$ ).....	97
4.2.3 – Porosidade Interna da Partícula ( $e_p$ ) e densidade seca ( $r_p$ ).....	98
4.3 – ESTUDO HIDRODINÂMICO DO REATOR DE LEITO FLUIDIZADO.....	98
4.4 – DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA DA CGTase WACKER.....	101
4.5 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CGTase WACKER LIOFILIZADA.....	102
4.6 – PURIFICAÇÃO DA ENZIMA CGTase POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE BIOESPECÍFICA (CAB).....	103
4.6.1 – Determinação da Atividade da CGTase WACKER Purificada por Cromatografia de Afinidade Bioespecífica (CAB).....	106
4.7 – IMOBILIZAÇÃO DA CGTase PURIFICADA PELO MÉTODO DA LIGAÇÃO COVALENTE.....	112
4.7.1 – Determinação da Atividade dos Filtrados da Imobilização.....	114
4.7.1.1 – Determinação da Atividade Total Imobilizada e da Atividade Máxima Teórica da Enzima Imobilizada.....	116
4.7.2 – Determinação da Atividade da CGTase Imobilizada (ICGTase).....	117
4.8 – PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS EM REATOR DE LEITO FLUIDIZADO (RLF) COM A ENZIMA CGTase IMOBILIZADA (ICGTase)....	126
<b>5 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>135</b>
<b>6 – SUGESTÕES.....</b>	<b>137</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>139</b>
<b>8 – ANEXOS.....</b>	<b>148</b>

8.1 – ANEXO 1 – TEORIA DA COMPLEXAÇÃO.....	148
8.1.1 – Processo de Cálculo da Constante de Equilíbrio ( $K$ ).....	150
8.1.2 – Cálculo da Concentração de CD de uma Amostra.....	150
8.2 – ANEXO 2 – INTERFERÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE DEXTRINA E DE $\gamma$ -CD NA DOSAGEM DE $\beta$ -CD.....	151
8.3 – ANEXO 3 – LISTAGENS DOS PROGRAMAS PARA O CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE $\beta$ -CD.....	153
8.3.1 – Programa 1.....	153
8.3.2 – Programa 2.....	157
8.4 – ANEXO 4 – DOSAGEM DE CICLODEXTRINAS PRODUZIDAS EM REATOR DE LEITO FLUIDIZADO EM FUNÇÃO DA MASSA DE ICGTase NO REATOR.....	161

## ÍNDICE DE FIGURAS

### 1 – INTRODUÇÃO

Figura 1.1 – Modelagem molecular para a $\alpha$ -CD.....	01
---	----

### 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 2.1 – Esquema da formação de ciclodextrinas a partir do amido.....	03
---	----

Figura 2.2 – Estrutura da $\alpha$ , $\beta$ , e $\gamma$ -ciclodextrina.....	04
---	----

Figura 2.3 – Estrutura e numeração dos átomos da $\beta$ -CD.....	06
---	----

Figura 2.4 – Representação esquemática da estrutura das ciclodextrinas.....	07
---	----

Figura 2.5 – Contornos moleculares lipofílicos para $\alpha$ -CD, $\beta$ -CD e $\gamma$ -CD.....	08
---	----

Figura 2.6 – Dimensões geométricas aproximadas das ciclodextrinas.....	09
--	----

Figura 2.7 – Representação esquemática da formação do complexo de inclusão $\beta$ -CD-benzaldeído em solução aquosa.....	13
---	----

Figura 2.8 – Reações envolvidas na cinética de produção das ciclodextrinas.....	31
---	----

Figura 2.9 – Classificação dos métodos de imobilização de enzimas.....	39
--	----

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 3.1 – Reator batelada tipo cesta, utilizado na determinação da atividade da enzima CGTase imobilizada.....	63
---	----

Figura 3.2 – Módulo experimental do reator de leito fluidizado, usado na produção de CDs.....	64
---	----

Figura 3.3 – Esquema da preparação do suporte para a cromatografia de afinidade bioespecífica (CAB).....	78
--	----

Figura 3.4 – Sistema utilizado na purificação da CGTase WACKER por cromatografia de afinidade bioespecífica.....	79
--	----

Figura 3.5 – Reação envolvida na etapa de silanização do suporte.....	80
Figura 3.6 – Reação envolvida na ativação do suporte silanizado.....	81
Figura 3.7 – Reação envolvida na etapa de imobilização da enzima.....	82
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
Figura 4.1 – Ajuste dos dados experimentais de absorvância em função da concentração de $\beta$ -CD.....	86
Figura 4.2 – Ajuste dos dados experimentais de absorvância em função da concentração de $\gamma$ -CD.....	88
Figura 4.3 – Ajuste dos dados experimentais de absorvância em função da concentração de dextrina.....	90
Figura 4.4 – Curva padrão para dosagem de $\gamma$ -CD pelo método colorimétrico do Verde de Bromocresol (BCG).....	91
Figura 4.5 – Curva padrão para dosagem de proteínas pelo método colorimétrico de Bradford.....	93
Figura 4.6 – Concentração aparente de proteína ( $C_P$ ) em função da concentração de $\beta$ -CD na amostra.....	94
Figura 4.7 – Concentração aparente de proteína ( $C_P$ ) em função da concentração de $\gamma$ -CD presente na amostra.....	95
Figura 4.8 – Distribuição de diâmetro das partículas de sílica de porosidade controlada (SPC), obtida pela análise granulométrica.....	97
Figura 4.9 – Relação entre a porosidade do leito fluidizado e a velocidade superficial do fluido, ajustada pela correlação de Richardson & Zaki (equação 2.2).....	100
Figura 4.10 – Curva de progresso da reação de formação de $\beta$ -CD catalisada pela enzima CGTase em solução (50°C, pH 8, substrato: dextrina 5 g/L)....	103

Figura 4.11 – Teor de proteína e atividade (50°C, pH 8, substrato: dextrina 5 g/L) das alíquotas coletadas na etapa de eluição da enzima CGTase na primeira cromatografia de afinidade bioespecífica.....	105
Figura 4.12 – Curva de progresso da reação de produção de $\beta$ -CD, catalisada pela enzima (em solução) CGTase purificada por CAB (50°C, pH 8, dextrina 5 g/L).....	107
Figura 4.13 – Formação de $\gamma$ -CD em função do tempo de reação para as diluições de 1:200, 1:300, 1:400 e 1:500 da solução enzimática estoque 1,64 mg/mL, bem como, o ajuste da porção linear dos dados experimentais.....	108
Figura 4.14 – Formação de $\gamma$ -CD em função do tempo de reação para as diluições de 1:600, 1:1000, 1:2000 e 1:3000 da solução enzimática estoque 1,64 mg/mL, bem como, o ajuste da porção linear dos dados experimentais.....	109
Figura 4.15 – Formação de $\gamma$ -CD em função do tempo de reação para a diluição de 1:4000 da solução enzimática estoque 1,64 mg/mL, bem como, o ajuste da porção linear dos dados experimentais.....	110
Figura 4.16 – Velocidade de formação de $\gamma$ -CD ( $V_{\gamma\text{-CD}}$ ) em função da quantidade total de proteína ( $m_p$ ) presente no ensaio.....	112
Figura 4.17 – Curvas de progresso da reação de formação de $\beta$ -CD em função do tempo de reação, utilizando-se os filtrados da imobilização.....	115
Figura 4.18 – Formação de $\beta$ -CD em função do tempo de reação, catalisada pela enzima imobilizada (50°C, pH 7, substrato: dextrina 5 g/L).....	118
Figura 4.19 – Formação de $\beta$ -CD em função do tempo de reação, catalisada pela enzima imobilizada (50°C, pH 7, substrato: dextrina 100 g/L).....	118
Figura 4.20 – Formação de $\beta$ -CD em função do tempo de reação, catalisada pela enzima imobilizada (50°C, pH 8, substrato: dextrina 5 g/L).....	119

Figura 4.21 – Formação de $\beta$ -CD em função do tempo de reação, catalisada pela enzima imobilizada (50°C, pH 8, substrato: dextrina 100 g/L).....	119
Figura 4.22 – Formação de $\gamma$ -CD em função do tempo de reação, catalisada pela enzima imobilizada (50°C, pH 7, substrato: dextrina 5 g/L).....	120
Figura 4.23 – Formação de $\gamma$ -CD em função do tempo de reação, catalisada pela enzima imobilizada (50°C, pH 7, substrato: dextrina 100 g/L).....	120
Figura 4.24 – Formação de $\gamma$ -CD em função do tempo de reação, catalisada pela enzima imobilizada (50°C, pH 8, substrato: dextrina 5 g/L).....	121
Figura 4.25 – Formação de $\gamma$ -CD em função do tempo de reação, catalisada pela enzima imobilizada (50°C, pH 8, substrato: dextrina 100 g/L).....	121
Figura 4.26 – Curvas de progresso da reação de formação de $\beta$ -CD, obtidas na determinação da atividade da CGTase estoque, purificada e imobilizada (50°C, pH 8, substrato: dextrina 5 g/L).....	125
Figura 4.27 – Produção de $\beta$ -CD em função da carga enzimática no reator de leito fluidizado, com a enzima CGTase imobilizada (50°C, pH 8, dextrina 100 g/L).....	130
Figura 4.28 – Produção de $\gamma$ -CD em função da carga enzimática no reator de leito fluidizado, com a enzima CGTase imobilizada (50°C, pH 8, dextrina 100 g/L).....	130
Figura 4.29 – Produção de ciclodextrinas, em g/L, em função da carga enzimática no reator de leito fluidizado (50°C, pH 8, dextrina 100 g/L).....	131
Figura 4.30 – Conversão de dextrina em CDs ( $\beta$ -CD e $\gamma$ -CD) em reator de leito fluidizado, em função do tempo de residência real do substrato no leito catalítico (50°C, pH 8, dextrina 100 g/L).....	131

## 8 – ANEXOS

Figura 8.1 – Concentrações de $\beta$ -CD medidas para as amostras coletadas, em cada tempo de operação do reator, para uma determinada carga enzimática ( $M_{EI}$ ).....	164
Figura 8.2 – Concentrações de $\beta$ -CD medidas para as amostras coletadas, em cada tempo de operação do reator, para uma determinada carga enzimática ( $M_{EI}$ ).....	165
Figura 8.3 – Concentrações de $\beta$ -CD medidas para as amostras coletadas, em cada tempo de operação do reator, para uma determinada carga enzimática ( $M_{EI}$ ).....	166
Figura 8.4 – Concentrações de $\gamma$ -CD medidas para as amostras coletadas, em cada tempo de operação do reator, para uma determinada carga enzimática ( $M_{EI}$ ).....	167
Figura 8.5 – Concentrações de $\gamma$ -CD medidas para as amostras coletadas, em cada tempo de operação do reator, para uma determinada carga enzimática ( $M_{EI}$ ).....	168
Figura 8.6 – Concentrações de $\gamma$ -CD medidas as amostras coletadas, em cada tempo de operação do reator, para uma determinada carga enzimática ( $M_{EI}$ ).....	169

## ÍNDICE DE TABELAS

### 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 2.1 – Propriedades físico-químicas das principais ciclodextrinas.....	09
Tabela 2.2 – Solubilidade das CDs em água, em várias temperaturas.....	11
Tabela 2.3 – Vantagens e aplicações das CDs em diversos setores industriais.....	21
Tabela 2.4 – Propriedades de CGTases produzidas por diferentes microorganismos.....	27
Tabela 2.5 – Razão de CDs produzidas por CGTases de diferentes fontes microbianas.....	28
Tabela 2.6 – Classificação dos suportes de acordo com a composição.....	40
Tabela 2.7 – Comparação entre os diferentes métodos de imobilização.....	42
Tabela 2.8 – Classificação dos reatores enzimáticos.....	45
Tabela 2.9 – Métodos e patentes sobre produção de ciclodextrinas.....	52
Tabela 2.10 – Imobilização da enzima CGTase.....	60

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 3.1 – Aberturas das peneiras do sistema Tyler utilizadas.....	70
--	----

### 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4.1 – Absorvância em função da concentração de $\beta$ -CD, obtida pelo método de dosagem colorimétrico da fenolftaleína.....	85
Tabela 4.2 – Absorvâncias obtidas na dosagem de $\gamma$ -CD pelo método da PHE.....	87
Tabela 4.3 – Absorvâncias obtidas na dosagem de dextrina pelo método da PHE....	89
Tabela 4.4 – Absorvâncias obtidas na dosagem de $\gamma$ -CD pelo método do BCG.....	91

Tabela 4.5 – Absorvâncias obtidas na dosagem de proteínas pelo método de Bradford.....	92
Tabela 4.6 – Absorvâncias a 595 nm em função da concentração de $\beta$ -CD e $\gamma$ -CD, obtidas pelo método de dosagem colorimétrico de Bradford.....	94
Tabela 4.7 – Frações mássicas retidas nas peneiras, após peneiramento de 10 g de SPC por 2 minutos, até peso constante.....	96
Tabela 4.8 – Frações mássicas retidas nas peneiras, após peneiramento de 10 g de SPC por 5 minutos, até peso constante.....	96
Tabela 4.9 – Resultados obtidos na determinação da densidade cristalina da SPC..	98
Tabela 4.10 – Resultados obtidos na determinação da porosidade interna da partícula ( $\epsilon_P$ ) e da densidade seca da SPC ( $\rho_P$ ).....	98
Tabela 4.11 – Velocidade superficial do fluido ( $u$ ) em função da porosidade do leito fluidizado ( $\epsilon$ ).....	99
Tabela 4.12 – Comparação entre os valores experimentais e teóricos dos parâmetros $u_t$ (velocidade terminal da partícula), $u_{mf}$ (velocidade mínima de fluidização) e $n$ (coeficiente de expansão do leito fluidizado).....	101
Tabela 4.13 – Concentração de proteína ( $C_P$ ) das soluções de CGTase WACKER obtidas pelo método colorimétrico de Bradford.....	102
Tabela 4.14 – Cromatografias de afinidade bioespecífica (CAB).....	104
Tabela 4.15 – Purificação da CGTase do <i>Bacillus alcalofílico</i> clonado em <i>E. coli</i> , por cromatografia de afinidade bioespecífica, utilizando $\beta$ -CD como ligante.....	106
Tabela 4.16 – Determinação das atividades ( $A$ ) e das atividades específicas ( $A_e$ ) da CGTase quanto à produção de $\gamma$ -CD, para as diluições ( $D$ ) 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:600, 1:1000, 1:2000, 1:3000 e 1:4000 da solução enzimática estoque (SE), cuja concentração é igual a 1,64 mg/mL.....	111

Tabela 4.17 – Velocidade de formação de $\gamma$ -CD ( $V_{\gamma\text{-CD}}$ ) em função da quantidade total de proteína presente no ensaio.....	111
Tabela 4.18 – Dosagem de proteína das soluções enzimáticas após a imobilização.....	113
Tabela 4.19 – Equações de ajuste dos resultados apresentados na figura 4.17.....	114
Tabela 4.20 – Atividade (A) e atividade específica ( $A_e$ ) das soluções enzimáticas após a imobilização.....	115
Tabela 4.21 – Atividades totais ( $A_T$ ) das soluções enzimáticas, antes e após a imobilização.....	117
Tabela 4.22 – Ajuste dos resultados de produção de CD em função do tempo de reação.....	122
Tabela 4.23 – Atividade da ICGase quanto à produção de $\beta$ -CD e $\gamma$ -CD (50°C).....	122
Tabela 4.24 – Atividade total da solução enzimática antes e após a imobilização, atividade da enzima imobilizada e rendimento em atividade.....	123
Tabela 4.25 – Alturas de leito fixo ( $H_0$ ) e fluidizado ( $H_{\text{médio}}$ ) em função da massa de enzima imobilizada ( $M_{EI}$ ) no reator.....	127
Tabela 4.26 – Valores das constantes da equação 4.16, para a $\beta$ -CD e para $\gamma$ -CD...	128
Tabela 4.27 – Conversão de dextrina em ciclodextrinas ( $\beta$ -CD e $\gamma$ -CD) em reator de leito fluidizado, em função da massa de enzima imobilizada.....	129
Tabela 4.28 – Valores das constantes da equação 4.16, ajustada aos resultados mostrados nas figuras 4.29 e 4.30.....	132
<b>8 – ANEXOS</b>	
Tabela 8.1 – Dosagem colorimétrica de $\beta$ -CD pela fenoltaleína.....	162
Tabela 8.2 – Dosagem colorimétrica de $\gamma$ -CD pelo Verde de Bromocresol.....	163

## NOMENCLATURA

[5]CD	-	Ciclodextrina com 5 unidades de glicose
A	-	Atividade enzimática em $\mu\text{moles de CD} / (\text{min} \times \text{mL}_{\text{solução enzimática}})$
a	-	Concentração total de fenoltaleína nas condições de dosagem ( M )
$A_i$	-	Atividade total imobilizada ( $\mu\text{moles/min}$ )
ABS	-	Absorvância da solução de dosagem na presença da molécula a dosar
$\text{ABS}_{\beta\text{-CD}}$	-	Absorvância correspondente somente à $\beta\text{-CD}$
$\text{ABS}_o$	-	Absorvância da solução de dosagem na ausência da molécula a dosar
ACD	-	$\alpha\text{-Ciclodextrina}$
$A_e$	-	Atividade específica em $\mu\text{moles de CD} / (\text{min} \times \text{mg}_{\text{proteína}})$
$A_{eEI}$	-	Atividade específica da enzima imobilizada em $\mu\text{moles CD} / (\text{min} \times \text{mg})$
$A_{EI}$	-	Atividade da enzima imobilizada em $\mu\text{moles CD} / (\text{min} \times \text{g}_{EI})$
$A_{mf}$	-	Atividade máxima teórica da enzima imobilizada ( $\mu\text{moles}/(\text{min} \times \text{g}_{EI})$ )
$A_T$	-	Atividade total ( $\mu\text{moles/min}$ )
$A_{Ta}$	-	Atividade total antes da imobilização ( $\mu\text{moles/min}$ )
$A_{Tf}$	-	Atividade total após a imobilização ( $\mu\text{moles/min}$ )
$A_R$	-	Área da seção reta do reator ( $\text{cm}^2$ )
b	-	Coeficiente angular da reta ajustada em $\mu\text{moles CD} / (\text{min} \times \text{mL})$
b'	-	Coeficiente angular da reta ajustada em $\text{mmoles CD} / \text{min}$
BCD	-	$\beta\text{-Ciclodextrina}$
BCG	-	Verde de bromocresol
$C_{\beta\text{-CD}}$	-	Concentração de $\beta\text{-ciclodextrina}$ (mM ou M)
$C_{\gamma\text{-CD}}$	-	Concentração de $\gamma\text{-CD}$ (mM ou M)
C6A	-	$\alpha\text{-Ciclodextrina}$
C7A	-	$\beta\text{-Ciclodextrina}$
C8A	-	$\gamma\text{-Ciclodextrina}$
$C_{Ai}$	-	Concentração inicial de dextrina ( g/L )
CAB	-	Cromatografia de afinidade bioespecífica
$C_{\text{DEXT}}$	-	Concentração de dextrina (g/L ou M)
CDs	-	Ciclodextrinas
c- $G_i$	-	Ciclodextrinas
CGTase	-	Enzima ciclodextrina Glicosiltransferase
CLAE	-	Cromatografia de afinidade
$C_P$	-	Concentração de proteína da solução enzimática (mg/mL)

D	- Diluição da solução enzimática
DE	- Dextrose equivalente
DEXTRINA/PHE	- Complexo dextrina-fenolftaleína
di	- Diâmetro interno do reator (mm ou cm)
DIMEB	- $\beta$ -ciclodextrina com 14 hidroxilas metiladas
dp	- Diâmetro médio das partículas de SPC (mm ou cm)
dpi	- Diâmetro das partículas retidas entre duas peneiras adjacentes (mm)
EI	- Enzima imobilizada
EL	- Enzima liofilizada
g	- Aceleração gravitacional ( $\text{cm/s}^2$ )
$G_{(n-i)}$	- Cadeia de amido encurtada de i unidades de glicose
$G_1$ - $\beta$ -CD	- Glicosil- $\beta$ -Ciclodextrina
$G_1$ -CDs	- Glicosil-Ciclodextrinas
$G_2$ - $\beta$ -CD	- Maltosil- $\beta$ -Ciclodextrina
$G_3$ - $\beta$ -CD	- di-maltosil- $\beta$ -Ciclodextrina
GCD	- $\gamma$ -Ciclodextrina
$G_n$	- Cadeia linear de amido com n unidade de 1,4- $\alpha$ -D-glucanopiranosil
$G_n$ -CDs	- Ciclodextrinas ramificadas
H	- Altura do leito de partículas (cm)
$H_{\text{médio}}$	- Média de três determinações da altura do leito fluidizado ( cm )
HA- $\beta$ -CDs	- Hidroxialquilados- $\beta$ -CDs
HE- $\beta$ -CD	- Hidroxietil- $\beta$ -CD
$H_0$	- Altura do leito fixo ( cm )
HP- $\beta$ -CD	- 2-hidroxipropil- $\beta$ -CD
ICGTase	- Ciclodextrina glicosiltransferase imobilizada
IMAC	- Cromatografia de afinidade pseudo bioespecífica
K	- Constante de equilíbrio do complexo ciclodextrina:hóspede
$K_{\beta\text{-CD}}$	- Constante de equilíbrio do complexo $\beta$ -ciclodextrina-fenolftaleína ( $M^{-1}$ )
$K_{\gamma\text{-CD}}$	- Constante de equilíbrio do complexo $\gamma$ -ciclodextrina-fenolftaleína ( $M^{-1}$ )
$K_{\text{dext}}$	- Constante de equilíbrio do complexo dextrina-fenolftaleína ( $M^{-1}$ )
L	- Comprimento do leito fixo
$LD_{50}$	- Dose letal por administração oral
$M_{EI}$	- Massa de enzima imobilizada, base seca (g)
$m_P$	- Massa total de proteína no ensaio (mg)
$M_S$	- Massa de sólido ou massa de SPC (g)
$M_{S1}$	- Massa de suporte ativado e seco por sucção ( g )

$M_{S2}$	- Massa de enzima imobilizada seca por sucção ( g )
$M_{SA}$	- Massa de suporte ativado seco (g)
$n$	- Coeficiente de expansão
$P_a$	- Massa de água (g)
$P_{EI}$	- Teor de proteína da enzima imobilizada ( mg de proteína / $g_{EI}$ )
PHE	- Fenolftaleína
$r$	- Coeficiente de correlação
$R_{ep}$	- Número de Reynolds da partícula
RLF	- Reator de leito fluidizado
SAB	- Albumina de Soro Bovino
SPC	- Sílica de porosidade controlada
$t$	- Tempo de reação (min)
$u$	- Velocidade superficial do fluido (cm/s)
$u_{mf}$	- Velocidade mínima de fluidização (cm/s)
$u_t$	- Velocidade terminal da partícula (cm/s)
$u_{tc}$	- Velocidade terminal corrigida da partícula (cm/s)
$V$	- Volume da solução enzimática (mL)
$V_{\gamma-CD}$	- Velocidade de formação de $\gamma$ -CD ( $\mu$ moles de $\gamma$ -CD/min )
$V_1$	- Volume do filtrado após a imobilização ( mL )
$V_2$	- Volume de água da lavagem da enzima imobilizada ( mL )
$V_2'$	- Volume de tampão tris-HCl da lavagem da enzima imobilizada ( mL )
$V_3$	- Volume de tampão tris-HCl + benzoato de sódio da lavagem da EI ( mL )
$V_a$	- Volume total de água (mL)
$V_b$	- Volume total do balão volumétrico aferido (mL)
$V_p$	- Volume total das partículas (cm <sup>3</sup> )
$V_R$	- Volume reacional (mL)
$V_S$	- Volume da matriz porosa (cm <sup>3</sup> )
$V_{SE}$	- Volume da solução enzimática diluída para as condições do teste (mL)
$V_t$	- Volume total do reator (cm <sup>3</sup> )
$V_{zp}$	- Volume de vazios das partículas (cm <sup>3</sup> )
$w$	- Concentração do complexo ciclodextrina-fenolftaleína ( M )
$x$	- Concentração total de ciclodextrina nas condições de dosagem ( M )
$X_A$	- Conversão total da dextrina em ciclodextrinas ( $\beta$ -CD e $\gamma$ -CD)
$X_{A\beta}$	- Conversão da dextrina em $\beta$ -CD
$X_{A\gamma}$	- Conversão da dextrina em $\gamma$ -CD
$\xi$	- Fração mássica das partículas retidas em cada peneira

$y$	- Concentração de fenolftaleína livre ( M )
$y_{\gamma\text{-CD}}$	- Concentração de PHE livre na dosagem da $\gamma$ -CD pelo método colorimétrico da fenolftaleína
$y_{\text{dext}}$	- Concentração de PHE livre na dosagem da dextrina pelo método colorimétrico da fenolftaleína
$\alpha\text{-CD}$	- Ciclodextrina com 6 unidades de glicose ou simplesmente $\alpha$ -Ciclodextrina
$\beta\text{-CD}$	- Ciclodextrina com 7 unidades de glicose ou simplesmente $\beta$ -Ciclodextrina
$\beta\text{-CGTase}$	- $\beta$ -ciclodextrina glicosiltransferase
$\delta\text{-CD}$	- Ciclodextrina com 9 unidades de glicose ou simplesmente $\delta$ -Ciclodextrina
$\Delta\text{ABS}_{\gamma\text{-CD}}$	- Excesso de absorvância causado pela interferência da $\gamma$ -CD, na dosagem da $\beta$ -CD pelo método da fenolftaleína
$\Delta\text{ABS}_{\text{dext}}$	- Excesso de absorvância causado pela interferência da dextrina, na dosagem da $\beta$ -CD pelo método da fenolftaleína
$\Delta P$	- Queda de pressão no leito fixo
$\varepsilon$	- Porosidade do leito fluidizado
$\varepsilon_{\text{mf}}$	- Porosidade do leito na condição de mínima fluidização
$\varepsilon_{\text{p}}$	- Porosidade interna da partícula
$\gamma\text{-APTS}$	- $\gamma$ -amino-propil-trietoxisilano
$\gamma\text{-CD}$	- Ciclodextrina com 8 unidades de glicose ou simplesmente $\gamma$ -Ciclodextrina
$\gamma\text{-CD/PHE}$	- Complexo $\gamma$ -ciclodextrina-fenolftaleína
$\mu$	- Viscosidade do líquido ou do fluido (g/(cm x s))
$\rho$	- Densidade do líquido ou do fluido (g/cm <sup>3</sup> )
$\rho_{\text{a}}$	- Densidade da água a 25°C (g/cm <sup>3</sup> )
$\rho_{\text{ap}}$	- Densidade úmida da partícula (g/cm <sup>3</sup> )
$\rho_{\text{p}}$	- Densidade da partícula seca (g/cm <sup>3</sup> )
$\rho_{\text{s}}$	- Densidade cristalina ou densidade da matriz porosa (g/cm <sup>3</sup> )
$\psi$	- Fator de forma da partícula

# 1 – INTRODUÇÃO

Ciclodextrinas (CDs), também conhecidas como dextrinas de Schardinger são oligossacarídeos cíclicos, não redutores, nos quais, as unidades de glicose estão unidas por ligações  $\alpha$ -1,4.

As ciclodextrinas contém um número variável de unidades de glicose, sendo as mais comuns constituídas de 6, 7 ou 8 unidades, sendo denominadas respectivamente de  $\alpha$ -CD (ciclohexaamilose),  $\beta$ -CD (cicloheptaamilose) ou  $\gamma$ -CD (ciclooctaamilose) (SZEJTLI, 1990; PEDERSEN et al., 1995).

A molécula de CD tem a forma de um tronco de cone invertido com as hidroxilas primárias e secundárias voltadas para a parte externa da molécula, tornando-as hidrofílicas. O interior das CDs é formado por uma cavidade revestida por grupos hidrofóbicos C-H e oxigênios glicosídicos, proporcionando um ambiente menos polar que aquele da água. A figura 1.1 mostra a modelagem molecular para a  $\alpha$ -CD, onde a figura da esquerda representa a abertura maior de cada cone molecular com as hidroxilas secundárias. A figura da direita representa o lado oposto dos cone, isto é, a abertura menor com as hidroxilas primárias (SZEJTLI, 1990; LICHTENTHALER & IMMEL, 1996).

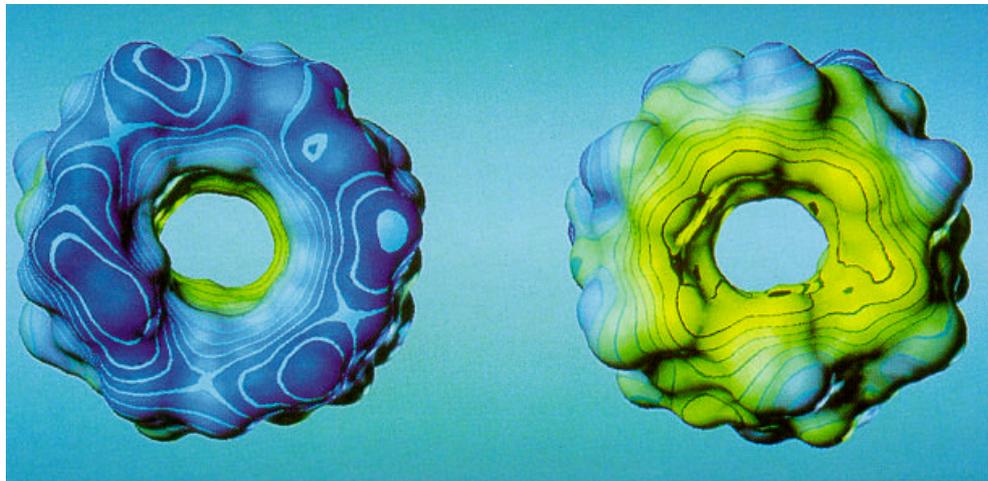


Figura 1.1 - Modelagem molecular para a  $\alpha$ -CD (LICHTENTHALER & IMMEL, 1996)

A cavidade hidrofóbica confere às CDs a capacidade de alojarem uma variedade de moléculas orgânicas, atuando como encapsuladoras ao nível molecular. Esta encapsulação molecular pode aumentar a solubilidade de moléculas pouco solúveis em água, e modificar as propriedades físicas e químicas das moléculas inclusas (SZEJTLI, 1990).

A  $\gamma$ -CD é a CD mais solúvel em água e apresenta uma maior cavidade, podendo ser usada na formação de complexos de inclusão com moléculas orgânicas de maior

dimensão, com as quais a  $\alpha$  e a  $\beta$ -CD não podem formar. Por isso, moléculas maiores, de interesse farmacológico, podem ser complexadas com a  $\gamma$ -CD, e sua maior solubilidade facilita a preparação de soluções mais concentradas contendo princípios ativos de interesse bioquímico (MORI et al., 1995; MATIOLI, 1997).

As CDs apresentam muitas aplicações de ordem prática. Encontram emprego na indústria química, como catalisadores, aplicações cromatográficas e inibidores de reações; na indústria de alimentos, para a adição de vitaminas e aditivos sob a forma de complexos de inclusão; na agricultura, na indústria farmacêutica e outros ramos de atividade industrial. Na indústria farmacêutica as CDs são utilizadas para vários fins, tais como: aumentar a estabilidade das moléculas hóspedes inclusas contra hidrólise, oxidação, fotodecomposição e desidratação; aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade do fármaco; converter substâncias voláteis e líquidas em formulações sólidas; corrigir o odor e o sabor desagradáveis do fármaco; e outras (KOROLKOVAS, 1991; OKADA et al., 1994a).

As CDs são produzidas a partir da degradação de carboidratos tais como o amido, glicogênio e maltooligosacarídeos, pela atuação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produzida por vários microorganismos, como por exemplo, *Bacillus macerans*, *megaterium*, *stearothermophilus*, entre outros. A origem da CGTase determinará a razão das CDs produzidas (SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991; OKADA et al., 1994a).

A enzima CGTase imobilizada permite a sua reutilização em várias conversões repetidas e permite o desenvolvimento de processos tecnológicos de conversão contínuos. Portanto, o uso de enzima imobilizada pode aumentar o volume de produção e reduzir o preço das CDs produzidas (SZEJTLI, 1988).

As CDs são produzidas industrialmente no Japão, França, Alemanha e Hungria, no entanto, somente no Japão, país onde há maior desenvolvimento e aplicação das CDs, é que começa a ser aplicada a tecnologia de enzima imobilizada na sua produção.

No Brasil, particularmente no Paraná, há grande disponibilidade de amido, o que torna atraente a perspectiva de produção de CDs a custos competitivos.

Devido às grandes vantagens oferecidas pelas ciclodextrinas e o fato de existir grande disponibilidade no Brasil de substrato para a sua preparação, neste trabalho objetivou-se produzir CDs a partir da enzima CGTase do *Bacillus alcalofílicus* sp. clonada em *E.coli*, utilizando a técnica de imobilização de enzimas. Sua produção foi realizada em reator de leito fluidizado, onde se pode obter maiores conversões em tempos menores que aqueles necessários numa operação batelada, utilizando a enzima em solução.

## 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - CICLODEXTRINAS

A degradação enzimática do amido com a  $\alpha$ -amilase resulta na produção de glicose, maltose, maltotriose, etc., ou seja, uma série de maltooligossacarídeos lineares ou ramificados conhecidos como maltodextrinas, ou simplesmente dextrinas. Esse tipo de degradação do amido é um processo hidrolítico, onde os produtos resultantes da quebra das ligações glicosídicas reagem com uma molécula de água. As dextrinas são substâncias heterogêneas, amorfas e higroscópicas, produzidas para uso nas indústrias alimentícias, têxteis e de papel, entre outras. São também consumidas sem prévio isolamento, em produtos tais como cerveja e pão.

No entanto, a degradação do amido pela enzima Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase), submete os produtos resultantes da quebra da cadeia à uma reação intramolecular, sem a participação da água, resultando na formação de produtos cíclicos, conhecidos como ciclodextrinas (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994). A figura 2.1 representa esquematicamente a formação de ciclodextrinas a partir do amido.

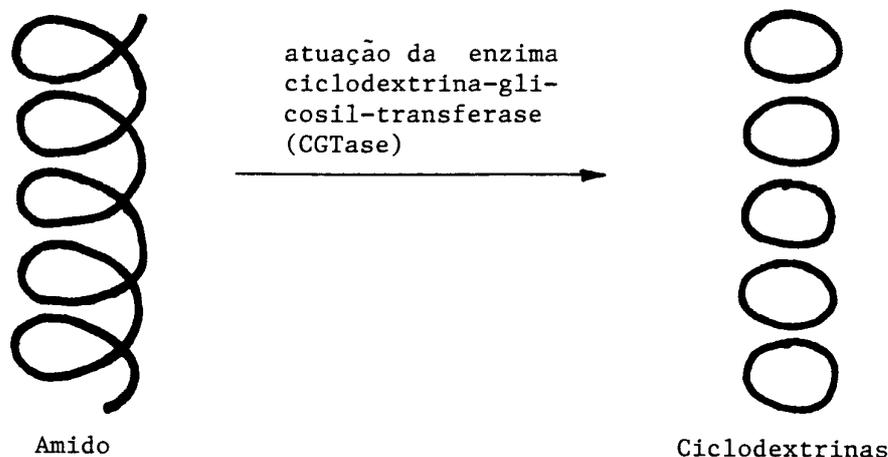


Figura 2.1 - Esquema da formação de ciclodextrinas a partir do amido (SZEJTLI, 1988)

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, contendo um mínimo de 6 unidades de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4, como na molécula de amilose. Desta família, as três mais conhecidas e produzidas industrialmente são a  $\alpha$ -,  $\beta$ - e a  $\gamma$ -ciclodextrina. A  $\alpha$ -ciclodextrina, também conhecida como  $\alpha$ -dextrina de Schardinger, ciclomaltohexaose, ciclohexaglucono, ciclohexaamilose,  $\alpha$ -CD, ACD e C6A é constituída de 6 unidades de glicose. A  $\beta$ -ciclodextrina, ou  $\beta$ -dextrina de Schardinger,

ciclomaltoheptaose, cicloheptaglucano, cicloheptaamilose,  $\beta$ -CD, BCD e C7A é constituída de 7 unidades de glicose. A  $\gamma$ -ciclodextrina, também conhecida por  $\gamma$ -dextrina de Schardinger, ciclomaltooctaose, ciclooctaglucano, ciclooctaamilose,  $\gamma$ -CD, GCD e C8A é constituída de 8 unidades de glicose (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994 e BEKERS et al., 1991). A figura 2.2 mostra a estrutura dessas três principais ciclodextrinas.

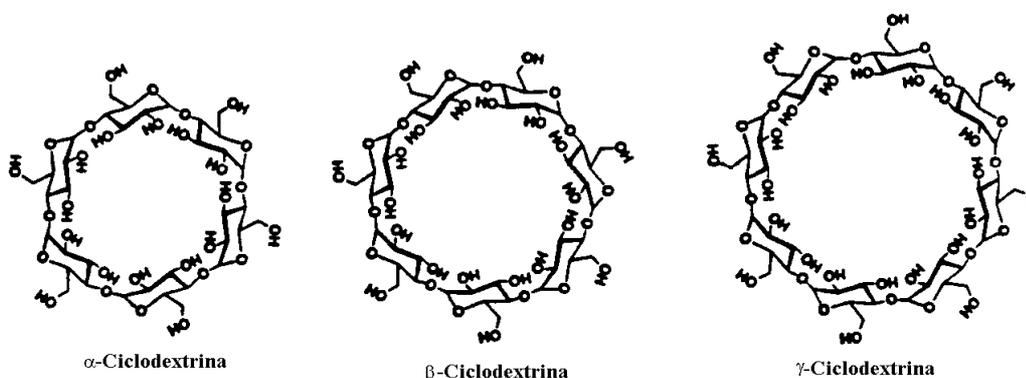


Figura 2.2 - Estrutura da  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrina (SZEJTLI, 1988)

Sundararajan & Rao (1970), citados por SZEJTLI, (1988), demonstraram por meio de um mapa de conformação energética que ciclodextrinas com menos de 6 unidades de glicose em seu anel não podem ser formadas por razões estéricas. No entanto, NAKAGAWA et al., (1996), prepararam uma CD com 5 unidades de glicose ([5]CD) usando dois métodos diferentes, a partir de D-glicose e maltose, e maltopentaose, respectivamente. Ciclodextrinas maiores (contendo nove ou mais unidades de glicose), ou seja,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\zeta$ - e  $\eta$ -ciclodextrinas também são encontradas, mas são difíceis de serem purificadas e apresentam pouca habilidade de complexação (BEKERS et al., 1991 e SZEJTLI, 1988). Das ciclodextrinas maiores somente a  $\delta$ -CD, contendo 9 unidades de glicose em seu anel, tem sido caracterizada satisfatoriamente, mas não é produzida industrialmente por não se conhecer nenhuma utilidade prática. Teoricamente, ciclodextrinas com dez ou mais unidades de glicose poderiam ser preparadas, entretanto, devido à alta solubilidade esperada em água e a fraca habilidade de complexação torna sua produção um desafio, sem nenhuma recompensa (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

### 2.1.1 - HISTÓRICO DAS CICLODEXTRINAS

De acordo com BEKERS et al., (1991), a primeira referência sobre as ciclodextrinas foi feita em 1891 por Villiers, quando foi isolada uma pequena quantidade de um substância cristalina a partir de um meio contendo amido onde estava crescendo uma cultura de *Bacillus amylobacter*. Esta substância foi denominada “celulosina”, devido à sua similaridade com a celulose. No período de 1903 a 1911 Schardinger contribuiu

para a elucidação da química das ciclodextrinas, caracterizando a substância cristalina isolada por Villiers como uma mistura de dois oligossacarídeos cíclicos, os quais foram denominados de dextrina cristalina  $\alpha$  e dextrina cristalina  $\beta$ ; também publicou a primeira descrição detalhada de preparação e isolamento desses oligossacarídeos cíclicos. Na literatura mais antiga, as ciclodextrinas são também conhecidas como dextrinas de Schardinger, cicloamiloses ou cicloglucanos.

Conforme citação feita por KOROLKOVAS, (1991), em 1938 Freudenberg et al. relataram que as ciclodextrinas são constituídas de unidades de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4, como na molécula de amilose. Em 1948 Freudenberg et al., verificaram a capacidade de formação de complexos de inclusão das ciclodextrinas e, mais tarde, assim como French et al., elaboraram processos de síntese de ciclodextrinas puras.

French & Rundle (1942) determinaram o peso molecular e o número de unidades de glicose da  $\alpha$  e  $\beta$ -ciclodextrinas. Entre 1945 e 1950, Freudenberg e Cramer estabeleceram o peso molecular e o número de unidades de glicose da  $\gamma$ -ciclodextrina (LIMA, 1996).

A partir de 1954, Cramer et al., realizaram estudos sistemáticos da formação de complexos de ciclodextrinas com outros compostos, e ainda reportaram que as ciclodextrinas atuam como catalisadores em algumas reações. Entre 1955 e 1960 realizaram-se os primeiros estudos sobre a formação de complexos de inclusão de ciclodextrinas com fármacos (KOROLKOVAS, 1991).

Segundo YANG & SU (1989), antes de 1976 já eram produzidas ciclodextrinas em escala laboratorial e semi-industrial. Os métodos de produção utilizavam baixa concentração de substrato e alguns precipitantes orgânicos. No entanto, os altos custos de produção desses métodos e os riscos à saúde, devido ao uso de solventes tóxicos, tornavam inviável sua produção em escala industrial. Em 1975, NAKAMURA & HORIKOSHI isolaram do solo o *Bacillus alcalofílico* sp. N<sup>o</sup> 38-2 e a CGTase obtida a partir desse microorganismo mostrou boas propriedades e produziu ciclodextrinas com altos rendimentos. Como resultado, foram desenvolvidos, após 1976, processos de produção de ciclodextrinas em escala industrial (NAKAMURA & HORIKOSHI, 1976).

Segundo SZEJTLI (1988), a década de oitenta até o presente, caracteriza-se pela produção industrial e utilização de ciclodextrinas quimicamente modificadas, especialmente a  $\beta$ -ciclodextrina.

Ciclodextrinas são produzidas em escala industrial pela empresa japonesa Nihon Shokuhin Kako Co (NSKK), sob a denominação de CELDEX. No Japão a produção

industrial de ciclodextrina atinge 600 t/ano, e a maior parte do produto tem sido utilizada pela indústria alimentícia (MATIOLI, 1997).

O aumento do interesse pelas ciclodextrinas (CDs) pode ser observado pelo crescimento exponencial no número de publicações. Segundo BENES & SZEJTLI (1996), em 1984 haviam 425 publicações sobre CDs, enquanto em 1994 esse número aumentou para 1421, o que corresponde a 3,9 publicações/dia em 1994, contra apenas 1,2 publicações/dia em 1984.

### 2.1.2 - ESTRUTURA E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas são substâncias cristalinas, homogêneas, não redutoras, hidrossolúveis e não higroscópicas, mas formam vários hidratos estáveis (KOROLKOVAS, 1991 e FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

Devido à conformação do C<sub>1</sub> dos resíduos de  $\alpha$ -D-glicopiranosil, como indicado na figura 2.3, e a falta de rotação livre ao redor das ligações glicosídicas, as moléculas de ciclodextrinas não são perfeitamente cilíndricas. Essas moléculas apresentam o formato de um tronco de cone invertido (ilustrado na figura 2.4), onde as hidroxilas secundárias ligadas aos átomos de C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> das unidades de glicose situam-se na base maior do tronco de cone, enquanto as hidroxilas primárias unidas ao C<sub>6</sub> encontram-se na base menor do tronco de cone. A diferença de tamanho das bases da estrutura deve-se à livre rotação das hidroxilas primárias, que contribuem para a redução do diâmetro efetivo da cavidade, enquanto as hidroxilas secundárias permanecem rígidas (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994; KOROLKOVAS, 1991 e BEKERS et al., 1991).

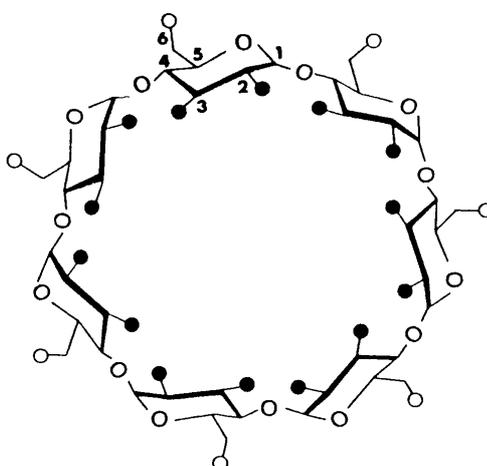


Figura 2.3 - Estrutura e numeração dos átomos da  $\beta$ -CD (BEKERS et al., 1991)

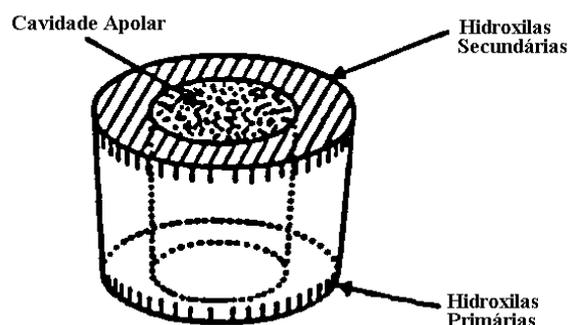


Figura 2.4 - Representação esquemática da estrutura das ciclodextrinas (SZEJTLI, 1988)

Na parte externa das moléculas de CDs encontram-se as hidroxilas secundárias e os grupos CH que compreendem H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>4</sub>, tornando as faces externas hidrofílicas (os sub-índices indicam átomos ligados aos carbonos numerados na figura 2.3). O interior do tronco de cone é revestido por dois anéis de grupos CH (H<sub>3</sub> e H<sub>5</sub>) e por um anel de átomos de oxigênio glicosídico (O<sub>4</sub>). Os pares de elétrons livres dos oxigênios glicosídicos estão voltados para o interior da cavidade, produzindo uma elevada densidade eletrônica, e por conseqüência um caráter apolar. Na figura 2.5 pode ser observado claramente as regiões hidrofílicas e hidrofóbicas das três principais CDs. Devido à natureza hidrofóbica da cavidade, moléculas de tamanho, forma e hidrofobicidade adequada são capazes de interagir de forma não covalente, para formar um complexo estável, por inclusão molecular. Essa propriedade chamada “encapsulação molecular” é capaz de aumentar a solubilidade de muitas moléculas hidrofóbicas e diminuir sua reatividade química, sendo útil portanto para melhorar as propriedades de substâncias instáveis, voláteis, oxidáveis e pouco solúveis (KOROLKOVAS, 1991; PENNINGA et al., 1993; FRÖMMING & SZEJTLI, 1994; OKADA, et al., 1994a; MATIOLI, 1997).

Como as hidroxilas ligadas aos átomos de C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>6</sub> estão orientadas para fora da molécula, elas podem sofrer ataque químico que modifica a estrutura das CDs sem alterar a sua cavidade central. Isso possibilita a transformação das CDs em derivados, com modificação de suas propriedades físico-químicas (KOROLKOVAS, 1991).

Diversos derivados de β-CD, com boa solubilidade em água, tem sido desenvolvidos, como por exemplo o hidroxipropil-β-CD, usado em aplicações farmacêuticas (HAUSLER & MULLER-GOYMANN, 1993).

As dimensões das CDs variam de acordo com o número de unidades de glicose. Como o diâmetro da cavidade interna das CDs é diferente, estas formam complexos de inclusão diferenciados, com diferentes tamanhos de moléculas hóspedes. A cavidade da

$\alpha$ -CD é pequena demais para incluir a maior parte dos princípios ativos, ao passo que a  $\beta$ -CD, ou melhor ainda, a  $\gamma$ -CD serve a este propósito (KOROLKOVAS, 1991; BEKERS et al., 1991). As dimensões das três principais CDs são mostradas na figura 2.6 e listadas na tabela 2.1. Nesta tabela ainda encontra-se algumas importantes propriedades físico-químicas das principais CDs.

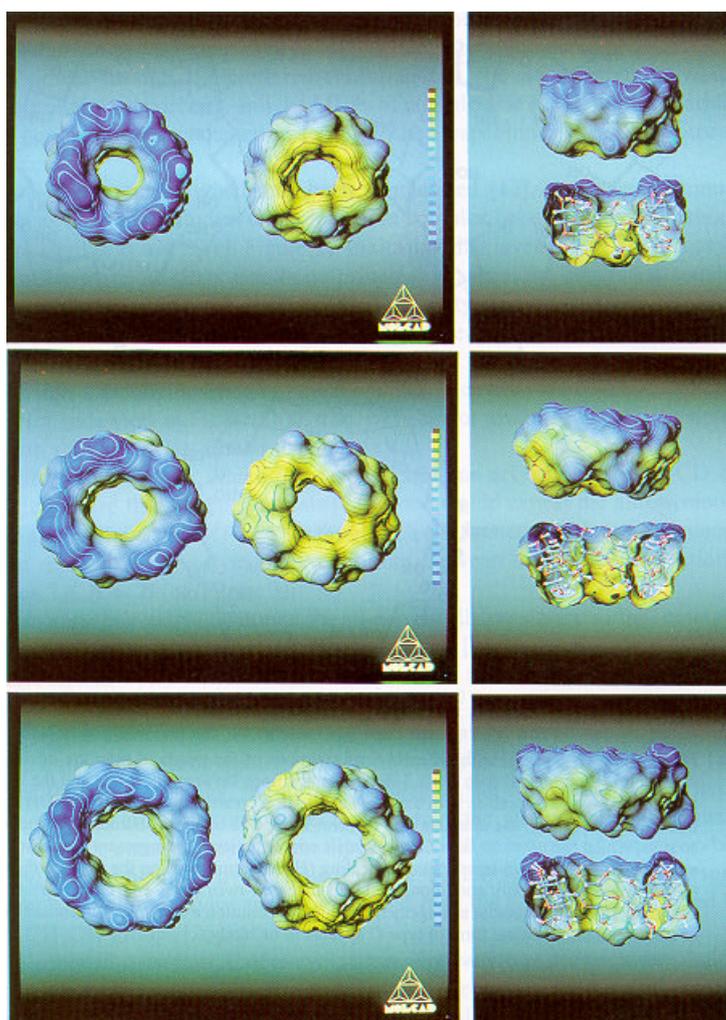


Figura 2.5 - Contornos moleculares lipofílicos para  $\alpha$ -CD (topo),  $\beta$ -CD (centro) e  $\gamma$ -CD (base). As figuras da esquerda representam a abertura maior de cada cone molecular com as hidroxilas secundárias. No centro, as figuras representam o lado oposto dos cones, isto é, a abertura menor com as hidroxilas primárias. As figuras da direita fornecem uma vista da forma fechada e dividida ao meio de cada CD. As regiões hidrofílicas (azuis) e hidrofóbicas (amarelas) são distribuídas claramente fora e dentro das moléculas (LICHTENTHALER & IMMEL, 1996).



Figura 2.6 - Dimensões geométricas aproximadas das ciclodextrinas (SZEJTLI,1988)

Tabela 2.1 - Propriedades físico-químicas das principais ciclodextrinas (HORIKOSHI, 1979; SZEJTLI, 1988; BEKERS et al.,1991; KOROLKOVAS, 1991; FRÖMMING & SZEJTLI, 1994)

Parâmetro	α-CD	β-CD	γ-CD
Número de unidades de glicose	6	7	8
Peso molecular	972	1135	1297
Solubilidade em água a 25°C (g/100 mL)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
Altura do tronco (Å)	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1
Diâmetro externo do tronco (Å)	14,6 ± 0,4	15,4 ± 0,4	17,5 ± 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 (água)	Placas hexagonais	Paralelogramos monoclínicos	Prismas quadráticos
Hidrólise por α-amilase do <i>A. oryzae</i>	Desprezível	Lenta	Rápida

A γ-CD por ser mais solúvel em água e possuir uma cavidade maior, é útil na formação de complexos de inclusão com substâncias que não são capazes de serem encapsuladas pela α- e β-CD (MORI et al., 1994). No entanto, para uso industrial, a β-CD é a mais importante pois seus complexos de inclusão são mais estáveis e são preparados com maior facilidade. Além disso, seu rendimento de produção a partir do amido é o mais alto, quando comparado com as outras CDs (HORIKOSHI, 1979; PONGSAWASKI & YAGISAWA, 1987).

O mais notável na tabela 2.1 é a baixa solubilidade da  $\beta$ -CD em água. Existem muitas ligações de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas secundárias de unidades de glicose consecutivas, tais como os OH em C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>. Um cinturão secundário completo é formado por essas ligações de hidrogênio na molécula de ciclodextrina, formando uma estrutura rígida e estável. Estas ligações de hidrogênio também impedem a hidratação da molécula de CD e isto, provavelmente, explica o fato da  $\beta$ -CD possuir uma solubilidade menor comparada às das outras ciclodextrinas. A destruição dessas ligações de hidrogênio por substâncias tais como a uréia, resulta num aumento da solubilidade da  $\beta$ -CD. Na molécula de  $\alpha$ -CD, esse cinturão de ligações de hidrogênio é incompleto, devido a posição distorcida de uma unidade de glicopironose. Como conseqüência somente quatro das seis ligações de hidrogênio podem ser estabelecidas. A  $\gamma$ -ciclodextrina possui uma estrutura não coplanar e flexível, e é portanto, a mais solúvel das três ciclodextrinas. De modo geral, a solubilidade em água das CDs tendem a aumentar com a elevação da temperatura, como pode ser observado na tabela 2.2 (BEKERS et al., 1991; KOROLKOVAS, 1991; HAUSLER & MULLER-GOYMANN, 1993; FRÖMMING & SZETLI, 1994).

Normalmente, a solubilidade das CDs diminui na presença de moléculas orgânicas, devido à formação de complexos de inclusão. Estes complexos são cristalinos e insolúveis, o que possibilita a separação de determinada CD de interesse (KOROLKOVAS, 1991; FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

Como os demais oligo e polissacarídeos não redutores, as CDs são estáveis em meio alcalino. Embora a sua hidrólise ácida parcial produza glicose e uma série de maltooligosacarídeos, as CDs são 2 a 5 vezes mais resistentes à hidrólise ácida que as dextrinas lineares correspondentes, dependendo da temperatura e da acidez do meio (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

As ciclodextrinas não são degradadas pela  $\beta$ -amilase, pois não possuem grupos terminais susceptíveis ao ataque desta enzima. Entretanto, e embora a uma taxa muito lenta, as  $\alpha$ -amilases são capazes de hidrolisar as ciclodextrinas, pois não requerem grupos terminais livres (SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991).

A  $\beta$ -CD é mais resistente à hidrólise pelas  $\alpha$ -amilases do que as dextrinas lineares. Amilases do *Aspergillus oryzae* e *Pseudomonas* e CGTases do *B. macerans* e *Bacillus* n<sup>o</sup> 38-2 degradam a  $\beta$ -CD; mas amilases do *B. subtilis* não conseguem degradá-la (HORIKOSHI, 1979).

As CDs são tão estáveis como a sacarose e o amido, podendo ser estocadas sem qualquer deterioração por vários anos. Possuem sabor adocicado, e esta é uma

propriedade que não deve ser ignorada quando forem utilizadas em processamento de alimentos (BEKERS et al., 1991; MATIOLI, 1997).

Tabela 2.2 - Solubilidade das CDs em água, em várias temperaturas (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994)

T (°C)	Solubilidade (mg CD/g água)		
	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -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	-

As ciclodextrinas não possuem ponto de fusão definido, mas começam a decompor-se a aproximadamente 200°C. As propriedades térmicas das CDs dependem do teor de água, da estrutura cristalina, da taxa de aquecimento e das condições atmosféricas (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

A viscosidade das soluções aquosas de CDs não diferem significativamente em relação à da água. Por exemplo, a 25°C a viscosidade da água pura é 8,93 mP, enquanto a da solução de  $\beta$ -CD  $9,5 \times 10^{-4}$  M é de 8,99 mP e da solução de  $\beta$ -CD  $9,98 \times 10^{-3}$  M é de 9,436 mP (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

O pKa das CDs, como pode ser observado na tabela 2.1, é de aproximadamente 12. Este valor é muito baixo comparado ao das dextrinas acíclicas; isto deve-se

provavelmente à estabilização do íon alcóxido por ligações de hidrogênio intramolecular com os grupos hidroxílicos vizinhos, combinado aos efeitos indutivos dos átomos de oxigênio eletronegativos. O grupo hidroxílico das CDs é ácido, embora muito fraco, e pode comportar-se como ácido numa ampla faixa de pH. Em solução fortemente alcalina, este grupo dissocia-se em seu ânion correspondente e pode agir como bases. Consequentemente, as ciclodextrinas podem atuar como enzimas, mas com atividade catalítica limitada. Este problema pode ser resolvido introduzindo grupos funcionais catalíticos potentes, como imidazol ou ácido hidroxâmico como catalisador hidrolítico eficaz, ou piridoxina como catalisador para a síntese de aminoácidos (BEKERS et al., 1991; KOROLKOVAS, 1991).

As cavidades das CDs cristalizadas de soluções aquosas não são vazias; encontram-se ocupadas por moléculas de água, distribuídas no interior da cavidade e na estrutura cristalina (água de cristalização). Quando os complexos de inclusão são formados, as moléculas de água ocupando a cavidade são expulsas, dando lugar à molécula hóspede apropriada (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

### 2.1.3 - COMPLEXOS DE INCLUSÃO: PROPRIEDADES E PREPARAÇÃO

Uma característica marcante das CDs é a habilidade de formação de complexos de inclusão com uma grande quantidade de compostos, isto é, o alojamento de moléculas hóspedes no interior de sua cavidade hidrofóbica. O parâmetro mais importante para a formação de complexos com substâncias hidrofóbicas é o tamanho tridimensional das CDs. A  $\alpha$ -CD forma complexos de inclusão com hidrocarbonetos alifáticos e também com gases, tais como etileno e dióxido de carbono. A  $\beta$ -CD forma complexos com moléculas tais como naftois e esteróides, enquanto a  $\gamma$ -CD pode alojar hóspedes como a vitamina D<sub>2</sub> (SCHMID, 1989; BEKERS et al., 1991; KOROLKOVAS, 1991).

Na ausência de molécula hóspede, a cavidade hidrofóbica, que atua como hospedeira, é ocupada por moléculas de água. Uma molécula hóspede específica sendo adicionada à solução de ciclodextrina, expulsará as moléculas de água, ocupando assim a cavidade hidrofóbica. A figura 2.7 ilustra esquematicamente a formação de um complexo de inclusão da  $\beta$ -CD em solução aquosa, com o benzaldeído. As moléculas de água, inicialmente alojadas na cavidade da CD, são substituídas pela molécula de benzaldeído (BEKERS et al., 1991; KOROLKOVAS, 1991).

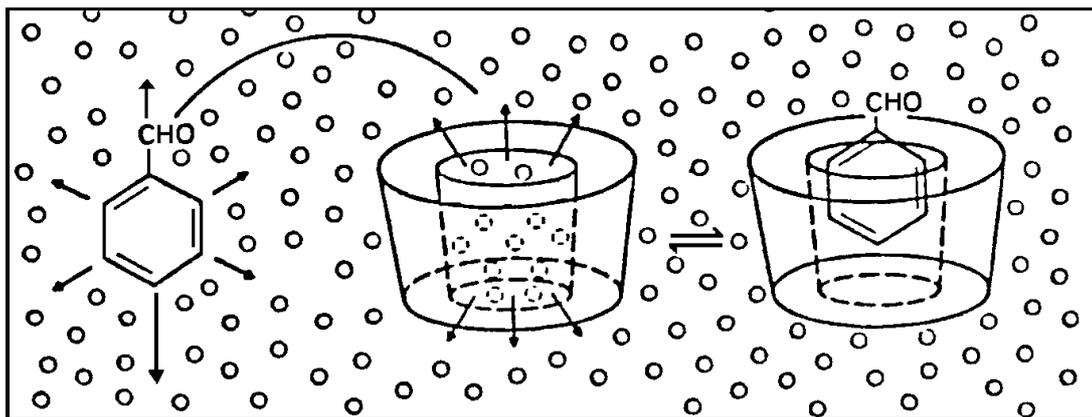


Figura 2.7 - Representação esquemática da formação do complexo de inclusão  $\beta$ -CD-benzaldeído em solução aquosa. Benzaldeído é a molécula hóspede e os pequenos círculos representam as moléculas de água (KOROLKOVAS, 1991).

O mínimo exigido para a formação desses complexos é que a molécula hóspede se ajuste inteiramente ou pelo menos parcialmente na cavidade. Moléculas muito pequenas não formarão complexos estáveis com as CDs, pois estas poderão escapar com facilidade da cavidade. O mesmo ocorre com moléculas muito volumosas, pois estas não conseguirão penetrar na cavidade. Entretanto, se alguns grupos ou cadeias laterais puderem penetrar na cavidade, a formação do complexo será possível. Normalmente os complexos formados estão na razão 1:1 (CD:hóspede), entretanto, se a molécula for muito longa para acomodar-se em apenas uma cavidade, sua outra extremidade pode alojar-se em outra cavidade, formando assim os complexos 2:1. Também podem ser formados complexos de inclusão nas razões 2:2, 3:1, 3:2, etc., e ainda 1:2 (BEKERS, et al., 1991).

Além da estequiometria, outro fator que determina se os complexos de inclusão podem ou não ser formados, é a polaridade das moléculas hóspedes. Em geral, moléculas hidrofóbicas ou resíduos hidrofóbicos possuem maior afinidade pela cavidade das CDs em solução aquosa. Complexos de espécies iônicas são menos estáveis do que espécies não ionizadas, pois a cavidade das CDs favorece a entrada dessas espécies; entretanto, pode haver exceções, como verificado em 1978 por Bergeron et al. (BEKERS, et al., 1991).

A formação dos complexos de inclusão é caracterizada por um variação de entalpia favorável e uma variação de entropia desfavorável. As forças de ligação envolvidas na formação desses complexos não estão ainda perfeitamente definidas; de modo geral, os complexos de CDs deveriam ser estabilizados por várias forças

intermoleculares entre a molécula hóspede e a molécula hospedeira, tais como: interações de Van der Waals (interações dipolo-dipolo induzido e forças de dispersão de London); ligações de hidrogênio; perda de alta energia das moléculas de água na formação do complexo; e, mudança de energia no anel macromolecular da CD, ou seja, variação da conformação de alta energia do complexo CD-água, pela conformação de menor energia do complexo CD-hóspede (BEKERS et al., 1991).

A encapsulação molecular pode ocorrer em solução ou no estado sólido; em solução há um equilíbrio entre as moléculas hóspedes complexadas e não complexadas e no estado sólido, estas moléculas podem estar inseridas na cavidade ou agregadas do lado externo das moléculas de CDs (BEKERS, et al., 1991).

Os complexos de inclusão podem ser preparados por diferentes métodos. Os mais comuns consistem em agitar uma solução aquosa de CD com a molécula hóspede ou sua solução, seguido da precipitação do pó macrocristalino e sua posterior separação por filtração. Os outros métodos são congelamento-secagem, spray-drying, prensagem, co-precipitação e neutralização. Os métodos de preparo sem o uso de solventes são: moagem-fundição e aquecimento em frasco selado (BEKERS, et al., 1991).

Segundo KOROLKOVAS, (1991), a  $\beta$ -CD é a mais utilizada para a formação de complexos de inclusão, e estes podem ser preparados por três diferentes meios, sendo que em todos é essencial dissolver a  $\beta$ -CD e as moléculas hóspedes. Esses meios de preparo são:

- 1) **Líquido-líquido:** consiste em agitar a solução de  $\beta$ -CD (quente ou fria; ácida ou básica) com a molécula hóspede; se esta for insolúvel em água, deverá ser dissolvida em solvente hidrossolúvel. O complexo cristalino formado é então filtrado e seco.
- 2) **Líquido-sólido:** consiste em misturar a  $\beta$ -CD e a molécula hóspede em um misturador potente, adicionando-se água para a formação de uma pasta. Esta pasta deverá ser agitada por um tempo suficiente para possibilitar que a  $\beta$ -CD e a molécula hóspede se dissolvam.
- 3) **Gás-líquido:** consiste na passagem de vapor por uma solução de  $\beta$ -CD, quente ou fria; isso é suficiente para que muitos solventes orgânicos ou outros produtos químicos se complexem com as moléculas de CD. O complexo formado pode ser separado por filtração.

Os complexos de inclusão de ciclodextrinas podem apresentar hidrossolubilidade mais alta do que os princípios ativos neles contido. São estáveis em solução e podem ser

recristalizados em água. Podem dissociar-se facilmente, liberando-se assim a molécula hóspede (KOROLKOVAS, 1991).

Quase todas as aplicações de CDs em formulações de drogas envolvem a complexação. Em muitos casos os complexos são separados na forma mais ou menos pura e utilizados como substâncias cristalinas (FRÖMMING & SZEJTIL, 1994).

A  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD, com diâmetros interno diferentes, são capazes de acomodar moléculas de tamanho diferente. Por exemplo, naftaleno é muito volumoso para complexar-se com a  $\alpha$ -CD, antraceno ajusta-se somente na cavidade da  $\gamma$ -CD, ácido propiônico é compatível com a  $\alpha$ -CD, mas não ajusta-se satisfatoriamente em cavidades maiores (FRÖMMING & SZEJTIL, 1994).

Existe também a possibilidade da inclusão de duas moléculas hóspedes em uma cavidade da mesma CD, formando-se assim os chamados complexos ternários. Esses complexos se formam quando moléculas hóspedes sozinhas não conseguem formar complexos cristalinos estáveis com as CDs, necessitando serem alojadas à cavidade da CD juntamente com outra molécula hóspede. Por exemplo, o dietiléter, que não forma complexo cristalino com CD, é capaz de formar um complexo ternário na presença do antraceno (FRÖMMING & SZEJTIL, 1994).

Os complexos ternários são sempre mais estáveis que os complexos binários, fato esse que pode ser observado pela ordem de grandeza da constante de estabilidade do complexo. Por exemplo, as constantes de estabilidade dos complexos binários  $\beta$ -CD-anilina e  $\beta$ -CD-n-propanol são  $46 \text{ M}^{-1}$  e  $5 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente, enquanto as constantes de estabilidade do complexo ternário  $\beta$ -CD-anilina-n-propanol é de  $353 \text{ M}^{-1}$  (FRÖMMING & SZEJTIL, 1994).

Como conseqüência da inclusão em solução de uma molécula hóspede na cavidade da CD tem-se: (i) modificação das propriedades espectrais do hóspede; (ii) modificação da reatividade da molécula inclusa. Em muitos casos a reatividade diminui, isto é, o hóspede é estabilizado, mas em outros casos a CD comporta-se como uma enzima, acelerando várias reações e modificando o caminho da reação; (iii) redução da difusão e da volatilidade de substâncias voláteis; (iv) moléculas hidrofóbicas tornam-se hidrofílicas após a complexação, e como conseqüência, há uma modificação em sua mobilidade cromatográfica (FRÖMMING & SZEJTIL, 1994).

Drogas inclusas sofrem modificações em suas propriedades físicas e químicas. Algumas modificações vantajosas dessa inclusão são: (i) estabilização de substâncias muito voláteis; (ii) aumento da solubilidade de substâncias pouco solúveis em água,

aumentado a sua utilidade farmacêutica e a sua biodisponibilidade após administração oral da droga; (iii) aumento da estabilidade física de suspensões; (iv) gostos e aromas desagradáveis podem ser mascarados; (v) estabilização de substâncias sensíveis à luz, oxigênio ou ácidos; (vi) redução na taxa de decomposição e hidrólise; (vii) possibilidade de formulações com drogas incompatíveis, por meio da proteção de uma delas pelas CDs; (viii) formulações líquidas podem ser transformadas em sólidas; (ix) preparação de produtos solúveis para uso em preparações injetáveis; e muitas outras vantagens (BEKERS et al., 1991).

Na indústria de alimentos, o principal valor reconhecido da inclusão é o aumento da estabilidade dos componentes inclusos (matéria-prima e produtos acabados), os quais na forma livre são voláteis, sensíveis à oxidação, fotoativos e/ou termoativos. Entre esses compostos, a inclusão de agentes aromatizantes, geralmente de alto valor comercial, é usada para melhorar a sua preservação. Adoçantes, extratos de plantas, óleos, vitaminas e anti-sépticos são também descritos como sendo mais estáveis, uma vez complexados (VAUTION et al., 1987).

#### 2.1.4 - DERIVADOS DE CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas contêm 18 ( $\alpha$ -CD), 21 ( $\beta$ -CD) ou 24 ( $\gamma$ -CD) hidroxilas, as quais podem ser modificadas quimicamente. Os grupos  $C_6$ -OH são mais reativos do que os grupos  $C_3$ -OH. A diferença entre sua reatividade não é extremamente alta, mas depende das condições de reação, como por exemplo, da temperatura e da alcalinidade. A preparação de derivados homogêneos e puros não é uma tarefa muito fácil e portanto, não são produzidos em escala industrial. A partir de 1990 tem sido publicados centenas de artigos e patentes, abordando a preparação, propriedades e utilização de CDs quimicamente modificadas (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

As CDs podem ser modificadas para diferentes propósitos, como por exemplo, aumentar a solubilidade da  $\beta$ -CD ou reduzir a toxicidade em aplicações parenterais. Os grupos hidroxílicos são utilizados como pontos iniciadores das modificações estruturais, permitindo a incorporação de vários grupos funcionais nas moléculas de CD. Dentre os vários tipos de derivados, estão os polímeros de CDs, as CDs ramificadas e, as CDs alquiladas e hidroxialquiladas, produzidas com a finalidade de se obter um melhor transportador de drogas (BEKERS et al., 1991).

Os derivados de  $\beta$ -CD têm obtido importância prática em aplicações farmacológicas, devido ao diâmetro de sua cavidade e ao seu preço. A  $\beta$ -CD possui uma baixa solubilidade em água, quando comparada às outras CDs, como pode ser

observado na tabela 2.1, e é a mais facilmente cristalizável. Um dos motivos que levam à modificação da  $\beta$ -CD é aumentar sua solubilidade e prevenir sua cristalização. Sua solubilidade pode ser drasticamente aumentada pela substituição de algumas hidroxilas por alguns grupos hidrofóbicos, tais como grupos alquilas ou ésteres (FRÖMMING & SZEJTILI, 1994).

Dependendo do grau de metilação, a solubilidade da  $\beta$ -CD (em água fria) aumenta até que aproximadamente 2/3 de todas as hidroxilas estejam metiladas, a partir desse ponto a solubilidade volta a diminuir novamente. Isto é, quando a  $\beta$ -CD contém 14 hidroxilas metiladas, ela apresenta a mais alta solubilidade, porém quando 21 hidroxilas são metiladas, a solubilidade é menor, sendo superior à da  $\beta$ -CD não substituída (FRÖMMING & SZEJTILI, 1994).

A  $\beta$ -CD com 14 hidroxilas metiladas (DIMEB) é solúvel em solventes orgânicos e muito solúvel em água fria; uma propriedade incomum da DIMEB é que soluções homogêneas e claras cristalizam com o aquecimento. A temperatura de cristalização depende da concentração da solução, mas sob determinadas condições essa cristalização ocorre numa faixa de meio grau. A sua redissolução por resfriamento é semelhantemente abrupta (FRÖMMING & SZEJTILI, 1994).

Outros derivados de CDs farmacologicamente importantes são os hidroxialquilados- $\beta$ -CDs (HA- $\beta$ -CDs), como por exemplo o 2-hidroxiopropil- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD) e o hidroxietil- $\beta$ -CD (HE- $\beta$ -CD). Os HA- $\beta$ -CDs são muito mais solúveis em água do que as CDs não modificadas, são poderosos solubilizadores de várias drogas e não precipitam na forma de complexos cristalinos em altas concentrações, fenômeno esse que é freqüentemente observado quando é usada a  $\beta$ -CD não modificada (BEKERS et al., 1991).

As CDs ramificadas ( $G_n$ -CDs,  $n=1,2,3,\dots$ ) são produzidas pela ação da CGTase sobre dextrinas ramificadas. As CDs ramificadas com  $n>2$  são degradadas a glicosil-CDs ( $G_1$ -CDs) ou diglicosil-CDs pela ação da glicoamilase. CDs ramificadas podem formar complexos de inclusão com vários tipos de substâncias, semelhantemente às CDs não modificadas, tendo aplicações como inibição de oxidação, remoção de gostos amargos, disfarce de odores desagradáveis e estabilização de aromas. São muito mais solúveis comparadas às CDs e são capazes de solubilizar vários tipos de substâncias oleosas (SAKAI et al., 1991).

As CDs ramificadas, tais como glicosil- $\beta$ -CD ( $G_1$ - $\beta$ -CD), maltosil- $\beta$ -CD ( $G_2$ - $\beta$ -CD) e di-maltosil- $\beta$ -CD ( $G_3$ - $\beta$ -CD) também são muito mais solúveis em água do que a  $\beta$ -CD não

modificada. Por exemplo, a solubilidade da  $\beta$ -CD a 25°C é de 1,85 g/100 mL, enquanto a da maltosil- $\beta$ -CD é de 151,6 g/100 mL, também a 25°C. A habilidade de complexação das G<sub>1</sub>-, G<sub>2</sub>- e G<sub>3</sub>- $\beta$ -CDs é a mesma observada com as outras ciclodextrinas; no entanto, o aumento da solubilidade de drogas pelas CDs ramificadas é muito mais pronunciado quando se utiliza a  $\beta$ -CD ( HISAMATSU & YAMADA, 1989; BEKERS et al., 1991).

Kitahata et al. e Abe et al., citados por SAKANO et al., (1988), relataram a síntese de maltosil-CDs (G<sub>2</sub>-CDs) a partir de maltosil-fluoreto e CDs usando a enzima pullulanase, e a partir de maltose e CDs usando a enzima isoamilase. Relataram também que a pullulanase do *Bacillus acidopullulyticus* sintetizou maltosil-CDs a partir de maltose e CDs com altos rendimentos, no entanto, esse método é desvantajoso para a produção industrial, pois a quantidade requerida de enzima é muito grande. Na tentativa de solucionar esse problema, SAKANO et al., (1988), imobilizaram a pullulanase, usando vários métodos, tais como adsorção física, ligação iônica e cross-linking, usando a enzima imobilizada na síntese de maltosil-CDs. A pullulanase imobilizada em vidro poroso sintetizou maltosil-CDs com rendimentos acima de 40% e ainda, as maltosil-CDs mostraram ser de 10-100 vezes mais solúveis em água e em solventes orgânicos, quando comparadas à solubilidade das CDs não modificadas.

Outros derivados de CDs igualmente interessantes são os polímeros de CDs, os quais são produtos contendo duas ou mais CDs unidas covalentemente. Esses polímeros de CDs, no caso de alto peso molecular, podem ser solúveis em água, inchando moderadamente, ou insolúveis, inchando intensamente. Os polímeros de CDs solúveis possuem de 2 a 5 unidades de CDs, enquanto os insolúveis possuem mais de 5 unidades. Esses polímeros são capazes de formar complexos de inclusão com várias drogas e podem ser aplicados em cromatografia de afinidade e inclusão de gel (BEKERS et al., 1991; FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

### 2.1.5 - METABOLISMO E TOXIDADE DAS CICLODEXTRINAS

As CDs são consumidas pelos seres humanos e pelos animais, sob a forma de fármacos, oralmente administrados, ou como aditivos alimentares. Em ambos os casos, as CDs podem estar presente na forma livre ou como complexos de inclusão, contendo a substância hóspede. A dosagem de CD é relativamente baixa e a concentração no suco gástrico resulta numa rápida dissociação do complexo. A molécula hóspede é rapidamente absorvida na corrente sangüínea, enquanto a CD é separada do processo. Apenas uma quantidade insignificante de CD é absorvida na forma intacta pelo trato intestinal (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

Algumas ciclodextrinas sofrem biotransformação no cólon. Esta biotransformação pode ser comparada à do amido (a não ser pela diferença fundamental que este é metabolizado no trato intestinal), mas à uma velocidade menor, o que se explica pelo fato das CDs não serem hidrolisadas pela  $\beta$ -amilase, mas somente pela  $\alpha$ -amilase, que promovem hidrólise muito lenta. Os metabólitos primários (maltodextrinas acíclicas, maltose e glicose) são então metabolizados e absorvidos, como o amido, e finalmente excretados como  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . A velocidade de degradação das CDs diminui na seqüência  $\gamma > \beta > \alpha$ . A  $\gamma$ -CD é a mais favorável para uso oral, pois é degradada no trato intestinal, enquanto a  $\alpha$  e  $\beta$ -CD somente são degradadas no cólon, pela flora bacteriana. A  $\alpha$ -CD é praticamente excretada de forma inalterada pelas fezes (KOROLKOVAS, 1991; FRÖMMING & SZEJTLI, 1994; ANTLSPERGER et al., 1996).

Os primeiros ensaios efetuados com ciclodextrinas, em animais de laboratório, em 1957, indicaram que elas eram muito tóxicas, havendo até causado a morte de alguns animais. Verificou-se, porém, que estas CDs continham impurezas, tais como solventes clorados ou aromáticos, e a isto devia-se a sua toxicidade. Ensaios com CDs purificadas provaram que são inócuas, ou seja, não manifestam ação tóxica; tampouco são teratogênicas ou mutagênicas, e conseqüentemente, podem ser utilizadas com a máxima segurança (KOROLKOVAS, 1991).

As CDs oralmente administradas não tem mostrado danos à saúde, pois apenas quantidades insignificantes são absorvidas pelo trato intestinal. Testes em ratos verificaram que apenas quando as CDs são administradas em grande quantidade ( $>10$  g/kg) revelam toxicidade aguda (BEKERS, et al., 1991).

Estudos metabólicos com  $\beta$ -CD e glicose, radiativamente marcadas, revelaram que após 30 minutos da administração oral, aproximadamente 5% da radioatividade referente à administração da glicose marcada e apenas 0,1% da radioatividade referente à administração da  $\beta$ -CD marcada foram detectadas no sangue. A  $\beta$ -CD é metabolizada pelas amilases da flora intestinal do cólon, onde são convertidas em glicose (BEKERS, et al., 1991).

A administração parenteral de CDs, particularmente da  $\beta$ -CD, pode causar nefrotoxicidade grave, devido à formação de complexos de baixa solubilidade entre a  $\beta$ -CD e o colesterol, os quais precipitam nos rins; podem causar também hemólise dos eritrócitos, iniciada a 3 mM, 6 mM e 16 mM, respectivamente para a  $\beta$ -,  $\alpha$ - e  $\gamma$ -CD (BEKERS et al., 1991).

HORIKOSHI (1979) realizando estudos toxicológicos em ratos albinos com  $\beta$ -CD, produzida pela CGTase do *Bacillus* nº 38-2, verificou que a dose letal de  $\beta$ -CD ( $LD_{50}$ ) por administração oral era de 18,1 g/kg corporal do animal. Verificou também que as CDs eram metabolizadas a uma taxa inicial mais lenta do que o amido, mas após 24 horas, a quantidade total metabolizada era praticamente a mesma.

### 2.1.6 - APLICAÇÕES DAS CICLODEXTRINAS

Desde a descoberta das CDs, em 1891, estes compostos têm sido muito estudados visando a sua aplicação no campo industrial. Esses produtos tem muitas aplicações e algumas delas são usadas atualmente. Com a descoberta da CGTase do *Bacillus* nº 38-2, tornou-se possível a produção de  $\beta$ -CD com alto rendimento e sem a utilização de agentes precipitantes, havendo assim uma redução em seu preço e tornando essa CD a mais utilizada pelo setor industrial (HORIKOSHI, 1979).

As CDs apresentam muitas aplicações de ordem prática. Encontram emprego na indústria química, como catalisadores, solventes cromatográficos e inibidores de reações; na indústria de alimentos, para a adição de vitaminas e aditivos sob a forma de complexos de inclusão; na agricultura; na indústria farmacêutica e outros ramos de atividade industrial (BEKERS et al., 1991; KOROLKOVAS, 1991).

As CDs podem ser utilizadas para: (i) estabilização de materiais voláteis (conversão de produtos tóxicos do estado líquido para o estado sólido; estabilização de aromas e sabores; desodorização de medicamentos e alimentos); (ii) proteção contra a oxidação e degradação UV durante a estocagem e o processamento; (iii) modificação das propriedades químicas e físicas (aumentar a solubilidade de medicamentos insolúveis em água; mascarar gostos amargos de alimentos e medicamentos; estabilizar produtos químicos que sofrem liqüefação, e promover a hidrólise de alguns ésteres); (iv) emulsificação de esteróides, hidrocarbonetos, óleos, gorduras e ácidos graxos; (v) solidificação de hidrocarbonetos, óleos, gorduras e ácidos graxos. Usando essas propriedades, muitas aplicações industriais para as CDs têm sido reportadas e algumas delas são apresentadas na tabela 2.3, juntamente com as vantagens de sua utilização (HORIKOSHI, 1979).

Tabela 2.3 - Vantagens e aplicações das CDs em diversos setores industriais

Setor	Vantagens	Aplicações	Referências
Alimentos	Estabilização de cores e de aromas; Redução de sabores e odores desagradáveis; Estabilização de emulsões Transformação de aditivos líquidos em pó;	Sucos de frutas, bombons e chá; Extrato de Plantas;  Molhos e queijos; Sopas de peixe, etc.	DUCHÊNE, 1987; SZEJTLI, 1988;  PSZCZOLA, 1988.
Farmacêutico	Estabilização (calor, oxidação); Aumento da biodisponibilidade Aumento da solubilidade	Antiinflamatórios; Substitutos sangüíneos;  Antibióticos e anticolesterol	DUCHÊNE, 1987; SZEJTLI, 1988; FRÖMMING & SZEJTLI, 1994
Cosméticos	Estabilização (calor, hidrólise, oxidação);  Redução da volatilidade; Transformação de aditivos líquidos em pó	Bases emulsificantes;  Loções, desodorantes; Cremes, pastas	FRÖMMING & SZEJTLI, 1994;  CITERNESI & SCIACCHITANO, 1995
Agrícola	Estabilização de fungicidas; Controle de germinação; Aumento da ação de pesticidas	Piretrinas;  Cereais;  Organofosforados	   SZEJTLI, 1988
Analítico	Interações específicas entre moléculas hóspedes e CDs;  Resolução ótica	Cromatografia de afinidade (CLAE);  Separação enantiomérica	ARMSTRONG et al., 1986;  ARMSTRONG, 1988
Outros	Redução de substâncias tóxicas Desintoxicação de tabaco e da rede de esgoto;  Aumento na qualidade das reproduções	Meio de cultivo de células microbianas  Produtos do tabaco  Fototermografia	SZEJTLI, 1986;  SZEJTLI, 1988;  SZEJTLI, 1990

#### 2.1.6.1 - APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Na indústria farmacêutica as ciclodextrinas são utilizadas para vários fins. A inclusão de fármaco na ciclodextrina pode alterar consideravelmente suas propriedades físicas e químicas.

As principais aplicações farmacêuticas das CDs são (BEKERS et al., 1991; KOROLKOVAS, 1991):

- i) Aumento da estabilidade das moléculas hóspedes inclusas contra hidrólise, oxidação, fotodecomposição e desidratação;
- ii) aumento da solubilidade de substâncias pouco solúveis em água, aumentando a sua utilidade farmacêutica e a sua biodisponibilidade após administração oral da droga;
- iii) aumento da estabilidade física de suspensões;
- iv) correção do odor e sabor desagradáveis do fármaco;
- v) possibilidade de formulações com drogas incompatíveis, por meio da proteção de uma delas pelas CDs;
- vi) conversão de substâncias voláteis e líquidas em formulações sólidas;
- vii) preparação de produtos solúveis para uso em preparações injetáveis;
- viii) redução da ação irritante do fármaco sobre as mucosas gástrica e intestinal e de outros efeitos adversos, como hemólise, por exemplo;
- ix) prevenção das interações fármaco-fármaco e/ou fármaco-aditivo.

#### **2.1.6.2 - APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA**

A primeira publicação referente à aplicação de ciclodextrinas na industrialização de alimentos data de 1962, tendo a partir desta data crescido consideravelmente, especialmente a partir de 1981, ano em que foi publicada uma coleção referente às aplicações das CDs neste setor industrial (VAUTION et al.,1987).

Há muitas substâncias usadas pelas indústrias de alimentos que são susceptíveis à formação de complexos de inclusão com as CDs, sendo incluídas antes de fazerem parte da composição dos alimentos, tais como aromas e sabores, adoçantes, produtos anti-bacterianos, enzimas, extratos vegetais, vitaminas, óleos e gorduras, e anti-oxidantes (VAUTION et al.,1987).

A principal vantagem da inclusão dos componentes alimentícios é o aumento da estabilidade dos componentes inclusos, quer sejam de matérias-primas ou de produtos acabados. A estabilização é essencialmente importante para produtos voláteis, fotoativos, termoativos e sensíveis à oxidação. A proteção de matérias-primas não diz respeito à proteção contra a ação de microorganismos, mas sim, proteção de produtos fisicamente e/ou quimicamente instáveis. Dentre os produtos, freqüentemente de alto valor comercial, que podem ser melhores conservados após a inclusão estão os agentes aromatizantes, adoçantes, extratos vegetais, óleos, vitaminas e anti-sépticos. A inclusão é responsável pela estabilização e pela melhoria da qualidade final do produto, com relação ao sabor, aroma, gosto, forma e cor dos alimentos. São exemplos de aplicações: sopas de peixe,

queijos, sucos de frutas, manteiga, chás, cremes, sucos de tomate, etc. (VAUTION et al.,1987).

As CDs são também utilizadas para a redução de acidez de algumas matérias-primas, tais como os óleos; para a eliminação de odores desagradáveis de muitas outras substâncias; aumento do poder de retenção dos produtos acabados, causando uma melhor retenção de água numa grande variedade de alimentos, tais como: massas, confeitos, temperos e queijos (VAUTION et al.,1987).

### 2.1.6.3 - APLICAÇÕES EM COSMÉTICOS

A vitamina C, essencial para a formação de colágeno é rapidamente alterada no ar e na luz, e estável até pH 5,4. Kanebo (1980), citado por VAUTION et al. (1987), esterificou essa substância utilizando um ácido graxo e incluiu o mono-éster obtido em  $\beta$ -CD, estabilizando-se assim o composto contra a ação da luz, calor e álcalis.

Muitos óleos essenciais são utilizados nas indústrias de cosméticos, as quais exploram suas diferentes atividades, como por exemplo a atividade anti-inflamatória da essência de camomila. No entanto, esses óleos são altamente instáveis, por serem facilmente oxidáveis e extremamente voláteis. Gyogyszer (1980), citado por VAUTION et al. (1987), estabilizou o extrato de camomila mediante sua inclusão com a  $\beta$ -CD, convertendo-o numa substância sólida. Esse método é extremamente útil para reduzir a perda de perfume por evaporação. Kernoczi et al. (1984), citado por VAUTION et al. (1987), melhoraram a preservação de diferentes óleos essenciais pela sua inclusão em CDs, e observaram que a inclusão provoca uma variação na composição desses óleos.

As CDs são utilizadas pelas indústrias de cosméticos com a finalidade de reduzir os efeitos irritantes de certas substâncias, como por exemplo as utilizadas em formulações de perfumes, e como redutoras de odores desagradáveis de certos componentes dos cosméticos. Segundo VAUTION et al., (1987), Shiseido (1982) utilizou as CDs para diminuir o odor da mercaptana, usada em preparações de fixadores de cabelo.

As ciclodextrinas são também empregadas como excipientes, em desodorantes ativos, para o corpo e para a boca; a ação desses desodorantes é explicada pelo aprisionamento dos odores desagradáveis pelas CDs. As CDs têm aplicações também na formulação de bases emulsificantes, desempenhando o papel de um surfactante hidrofílico, permitindo-se assim que óleo e água possam ser adicionados no agente emulsificante para se preparar a emulsão (VAUTION et al.,1987).

Xampus são cosméticos contendo uma alta proporção de surfactantes aniônicos. Alguns desses surfactantes podem causar irritação considerável. Entretanto, a irritação dos olhos e da pele causada por essas preparações aquosas é acentuada pela presença de perfumes. Essa irritação pode ser diminuída pelo uso da  $\beta$ -CD nas formulações desses produtos, além de auxiliar na estabilização do perfume e diminuir a presença da irritação causada por produtos de degradação (VAUTION et al., 1987).

#### **2.1.6.4 - APLICAÇÕES EM PRODUTOS AGRÍCOLAS**

A importância das CDs no setor agro-industrial é constatado pelo grande número de patentes e publicações abordando esse tema. As CDs são utilizadas em formulações de pesticidas, fungicidas, herbicidas, e muitas outras aplicações (VAUTION et al., 1987).

Os objetivos da inclusão dos pesticidas em CDs são o aumento e o prolongamento de sua atividade, bem como o aumento de sua estabilidade. Esses pesticidas, assim como as piretrinas e derivados, são compostos sintéticos ou mecânicos (derivados halogenados e fosforosos). A piretrina é uma formulação oleosa, muito sensível à luz, extremamente tóxica aos insetos e sensivelmente tóxica aos animais de sangue quente, o que torna sua utilização como inseticida muito limitada. No entanto, a inclusão das piretrinas com a  $\beta$ -CD produz formulações sólidas, facilmente manuseável e estáveis. Sua ação tóxica aos insetos é também prolongada, após sua aplicação (VAUTION et al., 1987; MATIOLI, 1997).

Os fungicidas e os herbicidas são incluídos em CDs com a finalidade de aumentar sua estabilidade, reduzir sua toxicidade, eliminar os odores desagradáveis e prolongar sua atividade (VAUTION et al., 1987).

A inclusão de compostos fornece também outras vantagens na agricultura. Por exemplo, a inclusão de hormônios de crescimento de plantas auxilia no aumento de sua estabilidade, além de prolongar o tempo de ação desses compostos. O tratamento de sementes com CDs resultou no atraso da germinação, mas produziu plantas mais resistentes (VAUTION et al., 1987).

#### **2.1.6.5 - APLICAÇÕES EM BIOTECNOLOGIA**

A aplicação de ciclodextrinas em biotecnologia teve início a partir dos anos 80. A maioria dos processos biotecnológicos envolve a transformação de um substrato em meio aquoso, catalisada por uma enzima. Essa transformação apresenta algumas

dificuldades, tais como: (i) o substrato é hidrofóbico, moderadamente solúvel em água; (ii) a enzima ou as células microbianas, produtoras da enzima, são sensíveis aos efeitos tóxicos do substrato ou inibidores, como os próprios produtos da reação; (iii) tanto o substrato quanto os produtos são instáveis sob determinadas condições de transformação enzimática; (iv) dificuldade de isolamento dos produtos do meio heterogêneo (SZEJTLI, 1990).

Por inclusão, as ciclodextrinas são capazes de solubilizar, em solução aquosa, o substrato e proteger as células microbianas dos efeitos tóxicos de um determinado substrato ou de seus produtos. O nível tolerável de substâncias tóxicas ou o crescimento de inibidores (se forem complexados com as CDs) pode ser consideravelmente elevado pela adição de CDs ao meio de células microbianas, resultando numa maior produtividade dos processos fermentativos, ou, níveis intoleráveis de substâncias tóxicas podem ser tolerados pelas células microbianas, na presença de um tipo e concentração adequada de CD (SZEJTLI, 1990).

Nos processos biotecnológicos (conversão microbiana, fermentação, etc.) seria esperado a formação de enzimas específicas que degradassem as ciclodextrinas. No entanto, as CDs e particularmente as CDs substituídas permanecem intactas na maioria desses processos, os quais utilizam populações microbianas homogêneas, podendo portanto serem recicladas (SZEJTLI, 1990).

As CDs encontram aplicações em processos biotecnológicos tais como: conversões microbiana de substratos; fermentações; produção de vacinas e antibióticos; reações enzimáticas de lipídeos, cultivo de células; tratamento de esgotos domésticos e industriais (SZEJTILI, 1990).

As principais vantagens na utilização de CDs em conversões microbianas são: solubilização de compostos orgânicos hidrofóbicos; redução da toxicidade do substrato e/ou produtos, os quais são nocivos ao biocatalisador; e, biocompatibilidade das CDs (BAR, 1996).

## **2.2 - ENZIMA CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE**

A enzima ciclodextrina glicosiltransferase (EC 2.4.1.19;  $\alpha$ -1,4-glucano-4-glicosiltransferase; CGTase), produzida por vários microorganismos, catalisa a degradação do amido ou substratos similares, tais como, amilose, amilopectina, glicogênio e maltooligossacarídeos, produzindo as ciclodextrinas (KATO & HORIKOSHI,

1986; PONGSAWASDI & YAGISAWA, 1987; SZEJTLI, 1988, KANEKO et al., 1990; OKADA et al., 1994a; LEE & TAO, 1995; PEDERSEN et al., 1995).

A CGTase é uma enzima monomérica, com peso molecular da ordem de 70-75 kD e apresenta uma sequência de aproximadamente 700 aminoácidos que revela uma similaridade estrutural com a enzima  $\alpha$ -amilase, sendo por isso considerada uma enzima da família das amilases (SCHMID, 1989; KANEKO et al., 1990; NAKAMURA et al., 1994).

Essa enzima é de fundamental importância na produção industrial de CDs (SZEJTLI, 1988).

### 2.2.1 - ORIGEM E PRODUÇÃO DA ENZIMA CGT ase

Desde a descoberta de uma CGTase num meio de cultura de *Bacillus macerans*, em 1939, a produção dessa enzima tem sido estudada em várias linhagens de bactérias, tais como *B. megaterium*, *Klebsiella pneumoniae*, *B. macerans*, *B. stearothermophilus*, *B. ohbensis* e *B. alcalofílico* sp. Essas enzimas apresentam diferentes propriedades enzimáticas, estabilidade térmica, pH ótimo para a atuação da enzima e produtos formados a partir do amido. Na maioria dos microorganismos estudados, as CGTases são enzimas extracelulares, diferindo entre si não só em suas propriedades, mas também na quantidade relativa de produtos formados a partir do amido (PONGSAWASDI & YAGISAWA, 1987; HORIKOSHI, 1988).

Evidentemente as enzimas das diferentes fontes diferem pelo menos em seus tamanhos e em suas estruturas protéicas (BENDER, 1981). Na tabela 2.4 são listadas algumas propriedades de CGTases obtidas de vários microorganismos.

Dentre os microorganismos utilizados como fonte da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, E.C.2.4.1.19) ou seja, *Klebsiella pneumoniae*, *B. alcalofílico* nº 38-2 e outros, o mais utilizado é o *Bacillus macerans*, no entanto, a enzima produzida por essa fonte não é termoestável o suficiente para ser usada em processos industriais e, o rendimento em CDs é abaixo de 55% (HORIKOSHI, 1988, SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991).

HORIKOSHI (1979) pesquisando a produção de enzimas a partir de microorganismos alcalofílicos, ou seja, crescendo em meio altamente alcalino, observou que a CGTase de uma dessas bactérias (*Bacillus alcalofílico* sp. nº 38-2), produzia preferencialmente  $\beta$ -CD em quantidades superiores às demais CGTases, além de apresentar alta estabilidade térmica.

NORMAN & JORGENSEN (1992) relataram que em 1985 seu grupo de pesquisa isolou uma nova CGTase a partir de uma linhagem de bactéria anaeróbia e termofílica, a *Thermoanaerobacter*. Essa enzima é extremamente estável e tem uma temperatura ótima de 90-95°C em pH 6. É ativa numa ampla faixa de pH e exibe mais de 80% da atividade numa faixa de pH de 5,0 – 6,7 (pH ótimo de 5,8). Na presença de amido é estável em temperaturas acima de 100°C, podendo ser utilizada para a produção de CDs (com ótimo rendimento na temperatura de 85-90°C e pH 5,5) e apresentando excelentes propriedades de liqüefação. É possível liqüefazer com essa enzima 35% do amido a pH 4,5 e na ausência de cloreto de cálcio, usando o mesmo processo desenvolvido para a  $\alpha$ -amilase do *B. licheniformis* (105°C por 5 min e 90-95°C por 90 min). Esta CGTase produziu  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD a partir do amido e não foi observado nenhum traço de oligossacarídeos de baixo peso molecular. Seu peso molecular foi estimado em aproximadamente 75 kD.

Tabela 2.4 - Propriedades de CGTases produzidas por diferentes microorganismos (SZEJTLI, 1988)

Fonte da enzima	pH ótimo	T ótima (°C)	Peso Molecular
<i>B.macerans</i> IFO 3490	5,0 – 7,0	55	65000
<i>B.macerans</i> IMA 1243	6,0	60	14500
<i>B.macerans</i> ATCC 8514	6,2		139300
<i>B.macerans</i> CHINOIN	5,9	60	72000
<i>B.megaterium</i>	5,0 – 5,7	55	66000
<i>B.stearothermophilus</i>	5,0 – 5,5		
<i>B.circulans</i>	6,0 – 6,5		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,2		
B. alcalofílico n° 38-2	4,5 – 9,0	45 – 90	85 – 88000
B. alcalofílico n° 17-1	5,0 - 9,0		
<i>B.ohbensis</i>	5,5		

PEDERSEN et al. (1995) isolaram, a partir de uma bactéria termofílica anaeróbia, a *Thermoanaerobacter*, uma CGTase ativa e estável a altas temperaturas e baixo pH. Sua temperatura e pH ótimos são de aproximadamente 90°C e 5,8, respectivamente.

Essa enzima produz uma mistura aproximadamente igual de  $\alpha$  e  $\beta$ -CD, e em menor quantidade  $\gamma$ -CD.

A razão das CDs produzidas é determinada pela origem da CGTase, não sendo porém valores fixos, pois muitas CGTases produzem inicialmente a  $\alpha$ -CD e a uma taxa mais lenta as CDs maiores. A  $\beta$ -CD raramente participa de reações reversas, sendo portanto acumuladas ao longo do tempo de reação à custa da  $\alpha$ -CD, que participa de reações de transferência secundárias. Portanto, a razão das CDs produzidas é também dependente do tempo de incubação da enzima no meio contendo amido. Nos processos industriais, a razão de CDs formadas é normalmente manipulada pela eliminação contínua da CD de interesse, por meio da formação de complexos insolúveis com determinados solventes orgânicos ou por diálise. A tabela 2.5 resume a razão das principais CDs formadas a partir de CGTases de diferentes fontes microbianas (SZJETLI, 1988; BEKERS et al., 1991).

Tabela 2.5 - Razão de CDs produzidas por CGTases de diferentes fontes microbianas (SABIONI & PARK, 1992).

Microorganismo	pH ótimo	Temperatura ótima	Razão de CDs formada (a:b:g)
<i>B.alcalofílico sp.</i>	6,5 – 8,0	60°C	$\beta$ -CD principalmente
<i>B.alcalofílico sp.</i>	4,5 – 9,0	45°C	1:11:1,5
<i>B. megaterium</i>	5,0 – 5,7	55°C	1:2,4:1
<i>B. macerans</i>	5,0 – 5,7	55°C	2,7:1:1
<i>B. circulans</i>	5,5	60°C	1:10,5:0
<i>B. amyloliquefaciens</i>	4,7 – 7,0	70°C	$\alpha$ -CD principalmente
<i>B. pneumoniae</i>	6,9	40°C	1:1,86:0,56
<i>B. lentus</i>	6,5 – 7,5	55°C	1:67:1,6

São conhecidas mais de 15 espécies de bactérias produtoras da CGTase. Quase todas elas podem ser classificadas em dois tipos: CGTases do tipo *Bacillus macerans*, que catalisam a formação de  $\alpha$ -CD no início da reação ( $\alpha$ -CGTases), ou CGTases do tipo *Bacillus alcalofílico*, que catalisam a formação da  $\beta$ -CD inicialmente ( $\beta$ -CGTases). KATO & HORIKOSHI (1986) isolaram uma nova bactéria (*Bacillus subtilis* nº 313), que produz uma CGTase que catalisa a formação de  $\gamma$ -CD e maltooligossacarídeos acíclicos no

estágio inicial da reação ( $\gamma$ -CGTase). HORIKOSHI (1988) com base no fato de que as CGTases produzem produtos cíclicos a partir do amido, concluiu que a “ $\gamma$ -CGTase” do *Bacillus subtilis* nº 313 poderia ser uma precursora de CGTases desenvolvida a partir de uma  $\alpha$ -amilase (KATO & HORIKOSHI, 1986; HORIKOSHI, 1988; ENGLBRECHT et al., 1990).

PONGSAWASDI & YAGISAWA (1987) estudando 14 linhagens diferentes de bactérias, isoladas do solo asiático e não identificadas, verificaram que a linhagem por eles designada de C31, a qual mostrou ser bem semelhante ao *B. macerans*, era a melhor linhagem produtora da enzima CGTase. Essa enzima produziu  $\beta$ -CD como produto principal da degradação do amido, em menor quantidade  $\alpha$ -CD e a  $\gamma$ -CD não foi detectada. A razão  $\beta$ -CD/ $\alpha$ -CD foi de 10,5.

SABIONI & PARK (1992) isolaram do solo brasileiro uma nova linhagem do *Bacillus* acalofílico, identificado como *Bacillus lentus*. A atividade de formação de CDs da CGTase purificada produzida por esse microorganismo, apresentou um ótimo em pH 6,5 – 8,5 e temperatura de 45 – 55°C. A estabilidade térmica e a atividade de formação de CDs dessa enzima foi melhorada pela adição de íons cálcio (5 mM). O máximo rendimento de conversão por essa enzima, de amido em CDs, foi de 65%, produzindo após 24 horas de reação  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD na proporção de 1:67:1,6.

MATIOLI (1997) pesquisando microorganismos produtores de CGTase, isolou 57 cepas, das quais, a cepa 37, identificada como *Bacillus firmus*, apresentou maior atividade num teste de precipitação de CD com tricloroetileno. Essa enzima após purificação, apresentou um peso molecular de 77,6 kD e foi utilizada na conversão de solução de maltodextrina 10% para CDs, numa operação em batelada de 22 horas, a 50°C e pH 8, alcançando um rendimento de 21,4%, sendo o produto principal a  $\beta$ -CD. Portanto, concluiu-se que a CGTase isolada tratava-se de uma  $\beta$ -CGTase. Essa enzima mostrou ser estável a 60°C e pH 8, na presença de íons cálcio. MATIOLI verificou ainda que com a adição de glicirrizina, como agente complexante, essa enzima degradava o amido de milho, produzindo preferencialmente  $\gamma$ -CD.

Na tentativa de se produzir  $\alpha$  e  $\gamma$ -CD de forma economicamente viável, tem sido realizados estudos no sentido de se modificar a CGTase por engenharia genética, com a finalidade de se desenvolver microorganismos mutantes específicos para a produção de um tipo de CD (PEDERSEN et al., 1995). Segundo SCHMID, (1989), a CGTase, uma enzima industrial assim como as proteases,  $\alpha$ -amilases e glicose isomerases, pode ser produzida em grande escala por meio da clonagem e expressão de genes, utilizando

como microorganismo hospedeiro *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*, os quais são bons produtores da enzima.

A expressão de genes de CGTases, seguida pela clonagem, pode aumentar significativamente o rendimento da enzima, além de simplificar sua purificação, caso o hospedeiro escreta apenas a CGTase ativa. O sobrenadante da cultura de CGTase pode ser usado diretamente na produção de CDs, se a concentração da enzima for alta o suficiente e livre de inibidores (SCHMID, 1989).

SCHMID e seu grupo (1989), em conjunto com o grupo A. Bock da Universidade de Munique, conseguiram a super produção e excreção de uma  $\alpha$ -CGTase, uma  $\beta$ -CGTase e uma  $\gamma$ -CGTase, a partir de *E. coli*. Entretanto, como uma quantidade considerável de CDs são utilizadas em processamento de alimentos, CGTases derivadas de *E. coli* não são adequadas. Assim, *Bacillus subtilis* pode ser uma hospedeiro mais aceitável.

### 2.2.2 - MECANISMO DE AÇÃO E ESTRUTURA MOLECULAR DA CGT ase

O mecanismo exato de atuação da CGTase sobre a molécula de amido ainda não está totalmente elucidado. Esta enzima catalisa a conversão do amido e outros  $\alpha$ -1,4 – glucanos em ciclodextrinas por meio de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular, também chamadas de reações de ciclização. Além dessas reações, as CGTases catalisam também reações de transglicosilação intermolecular (acoplamento e desproporcionamento), e em menor intensidade reações de hidrólise do amido. Uma das maiores dificuldades em se caracterizar essa enzima deve-se ao fato de que esta catalisa três diferentes reações, ou seja, a ciclização, o acoplamento e o desproporcionamento. Na figura 2.8 é mostrado um esquema simplificado dessas reações (NAKAMURA et al., 1994; OKADA et al., 1994a; LEE & TAO, 1995).

As CDs são produzidas a partir da reação de ciclização e nesse processo o substrato deve conter acima de seis unidades de glicose, e ainda estar na sua forma helicoidal. Normalmente a parte da cadeia de glicose contendo a extremidade não redutora é transferida para um receptor via hidroxila do C<sub>1</sub> para a hidroxila do C<sub>4</sub>. Nesta reação a extremidade não redutora atua como receptor para a extremidade redutora. Se o substrato tiver peso molecular inferior a seis unidades de glicose e superior à maltose, a CGTase é capaz de sintetizar oligômeros de maior peso molecular até superior a seis unidades de glicose, por meio das reações de desproporcionamento e então, produzir CDs. Pode-se considerar que a reação de ciclização é um caso especial da reação de desproporcionamento. Deve-se ressaltar que estas reações não são de hidrólise, pois

não há consumo de moléculas de água (BENDER, 1981; SZEJTLI, 1988; MATIOLI, 1997).

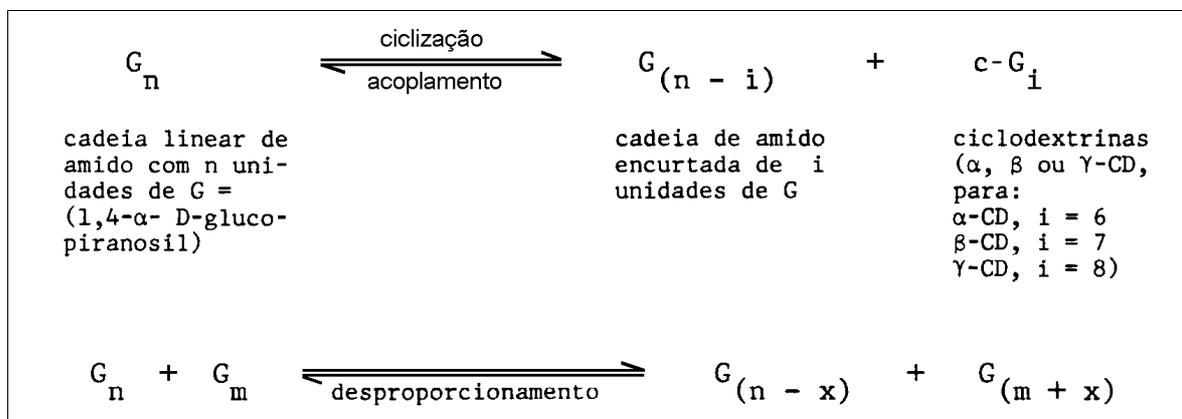


Figura 2.8 - Reações envolvidas na cinética de produção das ciclodextrinas (BENDER, 1981; LEE & TAO, 1995)

Imagina-se que a CGTase ataque os substratos exclusivamente a partir da extremidade não redutora da cadeia. Para se ter um maior entendimento das reações esquematizadas na figura 2.8 é necessário conhecer a natureza de  $G_n$ . Para a CGTase do *Klebsiella pneumoniae*, são necessárias cadeias de 1,4- $\alpha$ -D-glicopiranosil com 16 – 80 resíduos de glicopiranosil para se alcançar a taxa máxima de ciclização, indicando a dependência pela estrutura helicoidal do substrato. Cadeias com um número menor que 14 unidades de 1,4- $\alpha$ -D-glicopiranosil não podem ser ciclizadas diretamente e cadeias com um número superior a 100 unidades não constituem substratos adequados (BENDER, 1981).

A reação de ciclização é somente eficiente se forem usados substratos de cadeia longa ( $DE < 20$ ). Maiores concentrações de maltooligossacarídeos ou glicose favorecem a reação reversa, ou seja, acoplamento, resultando em produtos lineares e pequenas quantidades de CDs (SCHMID, 1989).

A reação de acoplamento, também conhecida como transglicosilação intermolecular, consiste na abertura do anel da CD com transferência dos maltooligossacarídeos produzidos para moléculas receptoras, tais como glicose ou sacarose. Esta reação ocorre na presença de certos co-substratos, existindo uma certa competição entre esta reação e aquela de ciclização (NAKAMURA et al., 1994; OKADA et al., 1994a).

A reação de acoplamento tem sido explorada para a síntese de nitrofenil-maltooligossacarídeos, os quais podem ser utilizados como substratos para a determinação da atividade da  $\alpha$ -amilase (SCHMID, 1989).

A reação de desproporcionamento ocorre principalmente no estágio inicial da reação enzimática, quando se utiliza substratos com longas cadeias, 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 na síntese de CDs (SCHMID, 1989).

A CGTase catalisa a transferência de resíduos de glicose a partir de um doador, tal como o amido, para um receptor apropriado. Os receptores mais efetivos tem uma configuração similar à da D-glicopironose, onde a transferência é para o grupo hidroxila na posição do C<sub>4</sub>. NORMAN & JORGENSEN (1992) estudaram a efetividade de diferentes açúcares e derivados como receptores na transglicosilação (acoplamento) com a CGTase da *Thermoanaerobacter sp.* Os receptores mais efetivos foram L-glicose, L-xilose, L-sorbose, D-glicose, D-xilose, 6-deoxi-D-glicose, metil- $\alpha$ -D-glicanopiranosídeo, fenil- $\beta$ -D-glicanopiranosídeo e sacarose. Maltose, celobiose, melibiose, 2-(hidroximetil)-fenil- $\beta$ -D-glicanopiranosídeo e inositol, também foram bons receptores. Entretanto, com galactose, manose e lactose não foi observada nenhuma transferência.

As características estruturais de açúcares utilizados como receptores pelas CGTases do *B. megaterium* e *B. macerans* foram investigadas por KITAHATA et al., (1978), usando 22 tipos de monossacarídeos e seus derivados. Concluíram com base nos resultados experimentais que para um receptor da reação de transferência intermolecular catalisada por essa enzima, a estrutura da piranose, contendo as mesmas configurações das hidroxilas livres do C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>, como na D-glicopiranosose, é a mais adequada. A CGTase do *B. macerans*, na presença de receptores apropriados (glicose e sacarose, por exemplo) catalisa também uma transglicosilação intermolecular, onde resíduos glicosil são transferidos da ciclodextrina ou maltooligossacarídeos para o receptor. Usando glicose como receptor, a CGTase produz maltose e outros maltooligossacarídeos. A CGTase do *B. megaterium* foi mais eficiente na transglicosilação do que a CGTase do *B. macerans*, com todos os receptores usados. Verificaram que D-glicose, D-xilose e L-sorbose mostraram ser receptores eficientes na transglicosilação das duas enzimas. Estudos estruturais dos produtos transferidos com D-xilose e L-sorbose como receptores, revelaram que os resíduos glicosil são preferencialmente transferidos para a hidroxila do C<sub>4</sub> da D-xilose e para a hidroxila do C<sub>3</sub>

da L-sorbose. Com todos os receptores testados, as taxas iniciais de degradação do amido pela CGTase do *B. megaterium* foi maior que a da CGTase do *B. macerans*, na presença do receptor. Os receptores que apresentaram forte atividade foram: L-sorbose, D-glicose, D-xilose, 6-deoxy-D-glicose, metil- $\alpha$  e  $\beta$ -glicosídeos e fenil- $\alpha$  e  $\beta$ -glicosídeos (Grupo A). Os receptores que foram eficientes, mas não tão fortes quanto os do grupo A foram: Deoxy-D-glicose e 3-O-metil-D-glicose (Grupo B). Os receptores que apresentaram pouca ou nenhuma atividade foram: Ácido D-glucurônico, D-galactose, D-arabiose, D-ribose e D-frutose (Grupo C).

### 2.2.3 - PURIFICAÇÃO DA ENZIMA CGT ase

A principal diferença entre a ação da CGTase e as outras enzimas que degradam o amido, é que seus produtos são não redutores. Na prática, as preparações enzimáticas contém outras enzimas amilolíticas, as quais reduzem a quantidade disponível de substrato e portanto reduzem o rendimento de ciclodextrinas, havendo assim a necessidade de purificar as soluções enzimáticas brutas (SZEJTLI, 1988).

A purificação da enzima aumenta significativamente sua atividade. O método mais simples de purificação é a passagem do meio de cultura através de filtro bacteriano, para a remoção das células. Outro método consiste em utilizar a cromatografia por afinidade e filtração por gel (KOROLKOVAS, 1991).

Schwimmer & Garibaldi (1950) purificaram uma enzima por adsorção em amido granular, seguido de fracionamento com etanol e precipitação com sulfato de amônio. Após ultra-centrifugação a enzima mostrou ser homogênea e livre de atividade hidrolítica, apresentando um peso molecular de 54 kD. Com esse método conseguiram concentrar a enzima 64 vezes (SICARD & SANIEZ, 1987; LÁSZLÓ et al., 1981).

Segundo LÁSZLÓ et al. (1981), em 1950, Norberg & French melhoraram o fracionamento com etanol e acetona seguido por adsorção em amido granular. Recuperaram 60% da atividade enzimática após eluição com solução de ciclodextrina, evaporação e diálise.

LÁSZLÓ et al. (1981) relaram a purificação de uma CGTase por Cramer & Steinle, em 1955, com um rendimento de 50-60%. Após repetida precipitação etanólica, a enzima foi separada por precipitação metanólica, sendo adicionado amido em excesso a essa solução. A CGTase foi separada das enzimas amilolíticas por fracionamento com sulfato de amônio.

Kitahata et al. (1974), citado por LÁSZLÓ et al. (1981), obtiveram a CGTase pura com 50% de rendimento, após fracionamento com sulfato de amônio, adsorção em amido granular, cromatografia em DEAE-celulose e Sephadex G-75. O fator de purificação foi de 130.

Segundo LÁSZLÓ et al., (1981), Horikoshi et al. reportaram a purificação de CGTase por adsorção em coluna de celulose DEAE previamente equilibrada com tampão pH 9. A eluição da enzima foi feita com NaCl 0,5 M e esta solução foi fracionada em colunas de Sephadex G-100 e Sephadex G-75.

De Pinto & Campbell, citados por LÁSZLÓ et al. (1981), obtiveram a enzima intracelular da linhagem ATCC 8514 por desintegração das células com ultra-som, e após precipitação com  $MnCl_2$  e sulfato de amônio; a enzima foi purificada por cromatografia em coluna sobre DEAE-celulose e poliácridamida. O peso molecular da enzima foi estimado em 139,3 kD.

HORIKOSHI (1988) purificou a CGTase do *Bacillus subtilis* n<sup>o</sup> 313 por precipitação fracionada do meio de cultura com sulfato de amônio, diálise do precipitado e fracionamento da enzima em coluna cromatográfica de DEAE-SEPHADEX A-50, seguido de filtração em gel, usando SEPHACRYL S-200, e posterior cromatografia em coluna, usando CM-TOYOPEARL 650 M. A enzima purificada apresentou um peso molecular de 64 kD, converteu amido em  $\gamma$ -CD com um pH ótimo de 8 e mostrou ser estável a 50°C numa faixa de pH de 5,5-8,5, após 30 minutos de incubação, sendo inativada a 70°C, na presença e ausência de íons cálcio.

A purificação da CGTase pode ser feita por cromatografia de afinidade, onde a enzima é purificada em gel de agarose macroporoso acoplado com  $\alpha$ -CD como ligante. Esse método pode ser aplicado diretamente no meio de cultura e o rendimento de purificação fica entre 90-92%, em relação ao caldo de fermentação (LÁSZLÓ et al., 1981).

A purificação de enzima por cromatografia de afinidade bioespecífica está baseada na formação de um complexo seletivo e reversível entre a proteína a recuperar e a outra molécula, no caso o ligante, que pode ser  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ -CD. A afinidade entre a molécula de interesse e o ligante somente existe quando há reconhecimento molecular entre as duas espécies. Os ligantes bioespecíficos apresentam as seguintes vantagens: (i) fornecem um grau de especificidade extremamente elevado e portanto uma pureza elevada no produto; (ii) uma separação rápida e geralmente em uma única etapa e, (iii) um rendimento em proteína também elevado, uma vez que é protegida da desnaturação por estabilização da estrutura terciária (BERNA, 1990).

LÁSZLÓ et al. (1981) purificaram a CGTase do *Bacillus macerans* ATCC 8515, usando gel de agarose macroporoso acoplado com  $\alpha$ -CD. O acoplamento foi feito com dioxirano (1,4-bis-2,3-epoxipropoxibutano), onde um dos grupos epoxi do dioxirano reage com a hidroxila da CD. A capacidade de ligação da enzima à CD acoplada ao gel foi de 40 mg/cm<sup>3</sup> de leito de gel. A eluição da enzima foi feita com solução de CD 10 mg/mL em coluna contendo o biogel e mantida a 15°C. O fator de purificação obtido foi de 113, com um rendimento de 90-92%. Seu peso molecular foi determinado por eletroforese, sendo estimado em 79 kD.

BERGSMA et al. (1988) purificaram a CGTase do *Bacillus circulans*, após sua recuperação do meio de cultura por ultrafiltração, utilizando cromatografia de afinidade bioespecífica em coluna contendo SEPHAROSE 6B ativada e  $\alpha$ -CD como ligante bioespecífico. A enzima foi eluída com uma solução de  $\alpha$ -CD (10 mg/mL). Foi recuperado 90,3% da enzima e 80% da atividade total. Comparado com a atividade inicial do meio de cultivo o fator de concentração foi de aproximadamente 500.

KANEKO et al. (1990) purificaram a CGTase do *Bacillus alcalofílico* sp. No.38-2 por adsorção em amido, seguido de cromatografia de troca iônica em DEAE-Toyopearl 650 M e filtração em gel de Toyopearl HW-55S. Essa enzima purificada apresentou um peso molecular de 75160. Purificaram também a CGTase do *Bacillus alcalofílico* sp. No.17-1 similarmente à CGTase 38-2, exceto a cromatografia iônica que foi feita com CM-Toyopearl 650 M. O peso molecular desta enzima foi estimado em 74140. As propriedades enzimáticas não sofreram variação em relação à enzima bruta. Na ciclização com uma suspensão de amido 10%, as enzimas purificadas produziram as mesmas quantidades de CDs que a enzima bruta produzia. KANEKO et al., verificaram ainda que as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos dessas enzimas eram homólogas, contudo, as propriedades enzimáticas eram distintas. A CGTase 38-2 é mais estável termicamente (65°C) que a CGTase 17-1 (53°C) e a CGTase 38-2 tem dois pHs ótimos para a atividade enzimática (pH 6 e pH 9), enquanto o pH ótimo da CGTase 17-1 é apenas um (pH 6).

SABIONI & PARK (1992) purificaram a CGTase do *Bacillus lentus*, usando fracionamento com sulfato de amônio (80% de saturação) e cromatografia em coluna de DEAE e CM-celulose, onde a CGTase foi eluída com uma solução de NaCl 0,1 – 1,0 M, em tampão borax 50 mM, pH 8,5. A enzima foi purificada 378 vezes com um rendimento de 20%.

MORI et al. (1994) purificaram a CGTase do *Bacillus brevisbacterium* sp. n<sup>o</sup> 9605 por cromatografia em coluna, usando butil-Toyopearl 650 M,  $\gamma$ -CD-Sepharose 4B e

Toyopearl HW-555. A enzima foi purificada 605 vezes com um rendimento de 16%. A enzima purificada apresentou um peso molecular de 75 kD, pH ótimo de 10 e temperatura ótima igual a 45°C. Essa enzima mostrou ser estável em pH 6-8 e a 55°C, na presença de íons cálcio, e, na conversão de amidos, amilopectinas e amiloses de cadeia curta, produziu  $\gamma$ -CD em maior quantidade, no estágio inicial da reação, com rendimento de 18-20%.

LEE & TAO (1995) purificaram a CGTase, obtida do *Bacillus macerans*, clonado em *E. coli*, usando a técnica de absorção da enzima em amido, com posterior purificação da solução enzimática obtida através de filtração em gel por cromatografia líquida, usando SEPHADEX G-75.

BERNA et al. (1996), purificaram a CGTase do *Bacillus alcalofílico* clonada em *E. coli*, por cromatografia de afinidade bioespecífica (CAB) e pseudo-bioespecífica (IMAC), utilizando como ligantes  $\beta$ -CD e Cu(II), Zn(II), respectivamente. A solução enzimática, com teor de proteína de 1,4 mg/mL e atividade de 41 U/mL, foi aplicada na coluna e a enzima foi eluída com tampão contendo 10 mg/mL de  $\beta$ -CD e NaCl 0,5 M, respectivamente para as colunas de  $\beta$ -CD-Sepharose 6B e Cu(II)-IDA-Sepharose 6B, Zn(II)-IDA-Sepharose 6B. O rendimento de purificação para CAB foi de 79%, com um fator de purificação de 1,40. Para a IMAC com Cu(II) o rendimento foi de 100%, com um fator de purificação igual a 1,2 e, com Zn(II) o rendimento foi de 87%, com um fator de purificação de 1,08. Esses autores purificaram também a CGTase por IMAC com coluna de Cu(II)-IDA-Sepharose 6B em série com Zn(II)-IDA-Sepharose 6B. Por meio deste sistema obtiveram um rendimento de 89%, com um fator de purificação semelhante ao da CAB, ou seja, 1,40. Concluíram que a IMAC em série é tão eficiente quanto a CAB para a purificação desta enzima, pois em ambos os processos a enzima estava próxima da homogeneidade. O peso molecular da enzima purificada, determinado por eletroforese, foi de 75 kD.

MATIOLI (1997) purificou a CGTase do *Bacillus firmus* por meio da precipitação com sulfato de amônio 80% de saturação, seguida de cromatografia de afinidade bioespecífica e ultrafiltração em microconcentradores. O fator de purificação foi de 157 e o rendimento em atividade de 65,3%.

### 2.3 - IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

As enzimas não têm sido tão amplamente utilizadas nos processos industriais devido, principalmente: (i) à baixa estabilidade nas condições de operação; (ii) ao elevado

custo de obtenção, e, (iii) à dificuldade de separação do substrato e produto para uso contínuo, pelo fato de serem moléculas solúveis em água (ZANIN, 1989).

Para superar estes problemas, e reunir as vantagens das enzimas sobre os catalisadores químicos, tem-se estudado meios de torná-las insolúveis na solução de substrato. Neste sentido, a enzimologia aplicada deu um grande passo no sentido de ligar química ou fisicamente as enzimas em suportes sólidos insolúveis no meio reacional, resultando deste processo as enzimas imobilizadas.

Desta forma, obtém-se catalisadores que, além de serem altamente específicos para um dado substrato, são mais estáveis e no final do processo são facilmente separáveis do produto, simplificando as etapas de purificação com consequentes vantagens econômicas no processo.

A definição para enzimas imobilizadas apresentada na primeira Conferência de Engenharia Enzimática realizada em Henniker (USA) em 1971, estabelece que enzimas imobilizadas são: “enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma certa região definida do espaço com retenção de sua atividade catalítica, e que podem ser usadas repetida e continuamente” (Wengard Jr., 1972, citado por ZANIN, 1989).

A imobilização de biocatalisadores é realizada não só com o propósito de atender aplicações puramente científicas, onde são utilizadas como modelos para estudar a relação entre a atividade catalítica e a estrutura protéica, mas principalmente visando o uso comercial em processos contínuos.

Do ponto de vista comercial, as principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas, em relação às enzimas solúveis são, praticamente, aquelas relativas à catálise química heterogênea (ZANIN, 1989):

- i) utilização da atividade catalítica por um maior período de tempo;
- ii) possibilidade de operação contínua do processo, com maior facilidade de controle;
- iii) facilidade de separação do produto final;
- iv) redução do volume de reação, pois permite uma alta concentração enzimática em menor volume de reator. Isto conduz a uma alta produtividade volumétrica (kg) por volume de reator ( $m^3$ ) e por hora. Também, pelo fato de que o substrato e o produto serem expostos a condições mais brandas e menor tempo de reação previne-se a ocorrência de reações indesejáveis;
- v) em alguns casos, ocorre modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima como por exemplo: maior estabilidade ao pH e à temperatura, etc.;

- vi) facilidade de interrupção da reação, em um nível desejado, pela remoção da enzima, caso o processo seja batelada, ou ajuste do tempo de residência se é usado um reator contínuo.

### 2.3.1 - MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A classificação das enzimas imobilizadas, de certa forma, depende da definição utilizada, sendo que o termo enzima imobilizada inclui: (ZANIN, 1989)

- i) modificação da enzima, por meio de técnicas apropriadas, para torná-las insolúveis em água;
- ii) enzimas solúveis, utilizadas em reatores equipados com membranas semi permeáveis de ultrafiltração que permitem a permeação dos produtos resultantes da hidrólise de substratos de alto peso molecular com retenção da molécula de enzima no interior do reator, (enzimas solúveis sem derivatização);
- iii) enzimas que tiveram sua mobilidade restringida pela ligação com outra molécula, mas permanecendo o complexo formado solúvel em água (enzimas solúveis com derivatização).

Na figura 2.9 apresenta-se uma das possíveis formas de classificar as enzimas imobilizadas. Esta foi sugerida por KENNEDY & WHITE (1985) e procura combinar a natureza da interação responsável pela imobilização e o tipo de suporte utilizado. Além dos métodos puros de imobilização, existem os combinados, por exemplo: adsorção + ligação cruzada intermolecular; ligação covalente + ligação cruzada, etc.

### 2.3.2 - SUPORTES PARA A IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Os principais componentes de um sistema de enzima imobilizada são: a enzima, o suporte e o modo de ligar a enzima ao suporte. Como componentes adicionais que contribuem para o melhor desempenho da enzima, e que devem ser levados em consideração na avaliação do sistema, têm-se: pH, temperatura, força iônica, pressão, agitação, liberação de cofatores e liberação do substrato com a remoção dos produtos. Estes fatores influem na performance do suporte, e portanto, afetam o comportamento da enzima.

De todos os fatores acima citados, com exceção da enzima, a maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte. Se de um lado um suporte criteriosamente selecionado pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, de outro uma escolha imprudente pode afetar adversamente não só o tempo de meia-vida mas a performance global do sistema. Disto conclui-se que não há um

suporte universal aplicável para todas as situações, havendo casos em que um suporte pode ser ruim para um dado processo podendo ser no entanto a melhor opção para outro.

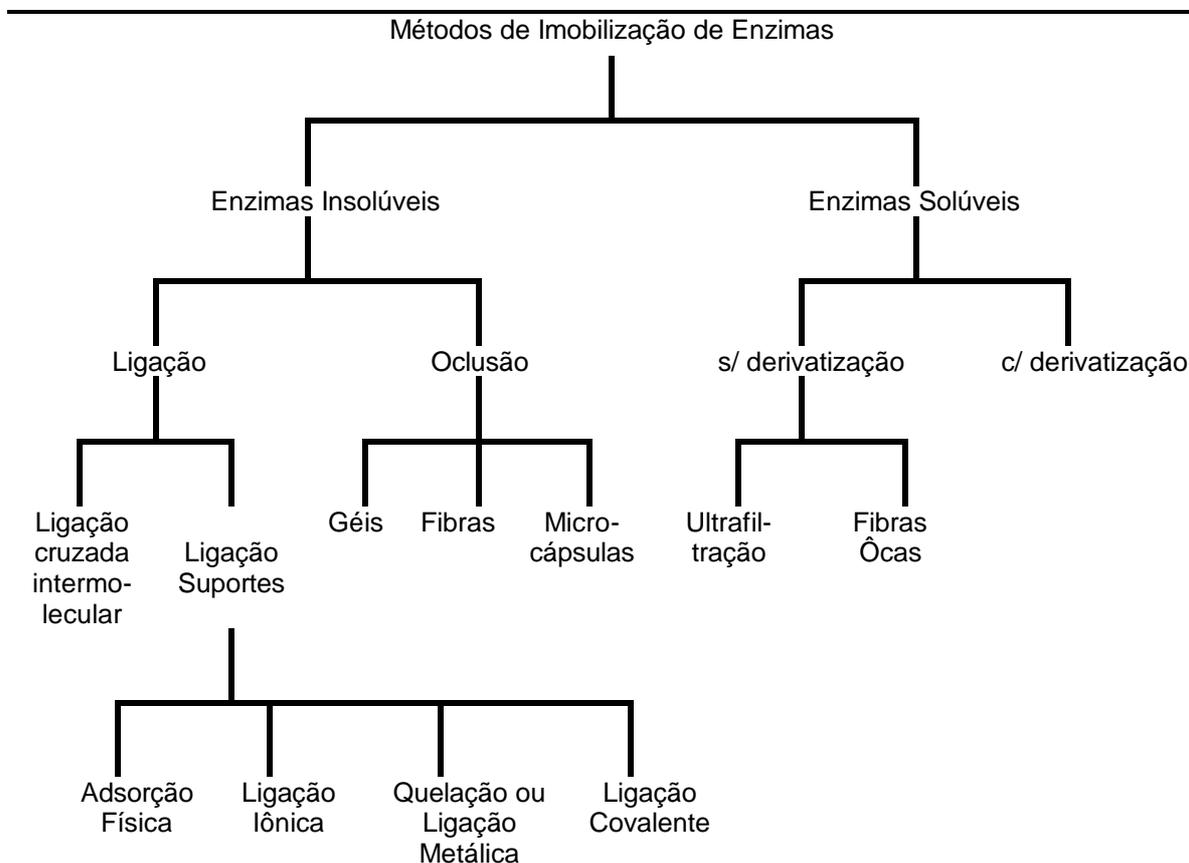


Figura 2.9 - Classificação dos métodos de imobilização de enzimas

Na seleção de um suporte, para uma determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como aquelas relativas à possibilidade de regeneração do material. As principais propriedades que devem ser analisadas são (ZANIN, 1989):

- i) contribuições da superfície do suporte, tais como: os micro-efeitos (pH, carga da superfície, natureza hidrofóbica e hidrofílica, efeito redutor e a presença de íons metálicos);
- ii) morfologia;
- iii) composição;
- iv) resistência ao ataque microbiológico;
- v) resistência mecânica;

- vi) resistência à compactação em operações a altas vazões quando se utiliza reatores de leito fixo.

Freqüentemente os suportes têm sido classificados conforme sua morfologia e composição, sendo que, na tabela 2.6 apresenta-se a classificação dos suportes de acordo com sua composição.

Tabela 2.6 - Classificação dos suportes de acordo com a composição.

SUPORTES ORGÂNICOS			SUPORTES INORGÂNICOS	
Naturais	Polissacarídeos	-celulose -agar -quitina -amido	Minerais	-areia -bentonita -horneblenda -pedra-pomes
	Proteínas	-colágeno -albumina -gelatina -seda		
Sintéticos	-poliestireno -poliacrilatos -polivinilos -nylon		Fabricados	-vidro de porosidade controlada -cerâmica de porosidade controlada -sílica de porosidade controlada -aluminossilicatos -óxido de ferro -óxido de níquel

A morfologia do suporte, no que concerne à área superficial e ao diâmetro dos poros é extremamente importante. Portanto, com relação à morfologia os suportes são reclassificados em:

- i) suportes não porosos;
- ii) porosos;
- iii) estrutura de gel.

Os suportes não porosos, têm como principal desvantagem, a baixa área superficial disponível para a ligação da enzima. Este problema pode ser parcialmente superado pela utilização de partículas finas ou fibras, porém, outras dificuldades surgem quando se utilizam partículas muito finas, como por exemplo, alta queda de pressão e baixas vazões para operação em reatores contínuos. A principal vantagem dos suportes não porosos é a eliminação de resistência à transferência de massa interna (ZANIN, 1989).

Os suportes porosos apresentam grande área superficial interna disponível para a imobilização da enzima que neste caso fica protegida das condições de turbulência externa. Como a maior parte da área disponível para a imobilização está na estrutura

interna, na utilização deste suporte, deve-se atentar para que o diâmetro do poro seja suficientemente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato.

Os suportes com estrutura de gel (colágeno, amido, etc.) apresentam severas limitações difusionais, sendo úteis somente para substratos de baixo peso molecular; além disso não podem ser utilizados em reatores tubulares devido a tendência à compactação induzindo a elevada queda de pressão no leito (ZANIN, 1989).

### **2.3.3 - SELEÇÃO DO SUPORTE E DO MÉTODO PARA A IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS**

#### **2.3.3.1 - SUPORTE**

Quando as enzimas são imobilizadas em suportes, deve-se levar em consideração além do suporte, o método de imobilização, pois a quantidade de enzima ligada, e a atividade após a imobilização são funções do suporte e da enzima.

Na seleção de um suporte para a imobilização de uma enzima devem ser considerados os seguintes aspectos (ZANIN, 1989):

- i) tamanho da partícula;
- ii) área superficial;
- iii) razão molar dos grupos hidrofílicos;
- iv) composição química.

De um modo geral, o acréscimo da razão de grupos hidrofílicos e da área superficial aumenta a quantidade de enzima ligada por unidade de suporte, resultando numa maior atividade da enzima imobilizada (ZANIN, 1989).

Na otimização de um suporte para uma aplicação específica, devem ser feitas algumas considerações. A primeira é conhecer a natureza catalítica da enzima, bem como as condições para sua performance ótima, pois destas depende o sucesso do suporte escolhido. Em relação ao tipo de suporte, deve-se conhecer o tipo de reator que será utilizado.

#### **2.3.3.2 - MÉTODO**

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, como no caso do suporte, não há um método aplicável para todas as enzimas. Isto deve-se às diferentes características e composição química das

enzimas, diferentes propriedades de substrato e produto, e à finalidade de aplicação do produto obtido. Por isso, para cada aplicação de uma enzima imobilizada é necessário se escolher o procedimento mais simples e mais barato, e que resulte numa enzima imobilizada com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional.

Entretanto, a partir da grande quantidade de informações disponíveis sobre as características do suporte e o efeito dos métodos utilizados, é possível fazer-se generalizações que permitem uma primeira seleção do método de imobilização. Na tabela 2.7 apresenta-se um resumo das dificuldades de cada método de imobilização, que serve como orientação para a seleção do método (ZANIN, 1989).

Quando a imobilização da enzima envolve uma reação química (ligação cruzada e ligação covalente), as condições de imobilização devem ser suaves para evitar a desativação do sítio ativo pelo envolvimento na reação química. Porém, se a imobilização com ligação química for bem sucedida, obtém-se uma enzima imobilizada com alta estabilidade devido à forte ligação resultante, e neste caso é difícil eluir a enzima do suporte. A ligação cruzada intermolecular, geralmente, não é adequada para aplicações industriais, devido a baixa estabilidade mecânica, enquanto a enzima ligada covalentemente em suportes orgânicos raramente pode ser regenerada e portanto, é pouco atrativa para uso em grande escala.

Tabela 2.7 - Comparação entre os diferentes métodos de imobilização

CARACTERÍSTICA	LIGAÇÃO CRUZADA	ADSORÇÃO FÍSICA	LIGAÇÃO IÔNICA	QUELAÇÃO OU LIGAÇÃO METÁLICA	LIGAÇÃO COVALENTE	OCCLUSÃO
Dificuldade de preparação	Intermediária	Simples	Simples	Simples	Difícil	Difícil
Força da ligação	Forte	Fraca	Intermediária	Intermediária	Forte	Intermediária
Atividade enzimática	Baixa	Intermediária	Alta	Alta	Alta	Baixa
Regeneração do suporte	Impossível	Possível	Possível	Possível	Rara	Impossível
Custo de imobilização	Intermediário	Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Intermediário
Estabilidade	Alta	Baixa	Intermediária	Intermediária	Alta	Alta
Aplicabilidade Geral	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim

#### 2.3.4 - MÉTODO DA LIGAÇÃO COVALENTE

Os métodos de imobilização de enzimas em suportes inorgânicos podem ser divididos em dois grupos básicos de acordo com a força de ligação existente entre as moléculas da enzima e o suporte (ZANIN, 1989):

- i) relativamente fraca – adsorção, ligação iônica e ligação metálica;
- ii) relativamente forte – ligação covalente.

O método de ligação covalente de enzimas em suportes inorgânicos, é o mais difundido e o mais pesquisado. A seleção das condições de imobilização é mais difícil do que nos outros métodos, e freqüentemente é mais complexo e necessita condições menos brandas do que os outros (tabela 2.7). Como a ligação formada é forte, a enzima imobilizada obtida por este método é estável não permitindo que a enzima se solte do suporte em presença do substrato ou de soluções de alta concentração iônica.

Os grupos funcionais da enzima que tomam parte na ligação destas com o suporte são (ZANIN, 1989):

- i) grupos aminos:  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> da cadeia terminal e o  $\epsilon$ -amino da lisina;
- ii) grupos carboxílicos:  $\beta$  e  $\gamma$  do ácido aspártico e glutâmico, respectivamente, e o  $\alpha$ -carboxílico;
- iii) grupo fenólico da tirosina;
- iv) grupo sulfidrílico da cisteína;
- v) grupo hidroxílico da serina, treonina e tirosina;
- vi) grupo imidazol da histidina;
- vii) grupo indol do triptofano.

Nas reações de imobilização, estes grupos funcionais reagem com os suportes que contenham grupos diazônio, isocianetos, haletos e azidas (ZANIN, 1989). Alguns destes grupos, podem reagir diretamente com o suporte, por exemplo, grupo SH, outros, como os grupos OH devem ser ativados antes de se ligar ao suporte, uma vez que a maioria dos suportes utilizados não apresentam os grupos reativos.

A ativação do grupo ligante é freqüentemente realizada no suporte a fim de reduzir o risco de diminuição da atividade catalítica da enzima. As reações de ativação do suporte podem ser classificadas em (ZANIN, 1989):

- i) diazotização;
- ii) formação de uma ligação amida;
- iii) alquilação e arilação;
- iv) formação de base de Schiff;
- v) reação de Ugi;
- vi) reações de amidinação;
- vii) troca de dissulfeto-tiol;
- viii) interações enzima-mercúrio;

ix) ligação induzida por radiação;

Os materiais inorgânicos mais comumente utilizados para a imobilização de enzimas são: cerâmica, vidro, sílica e metais. Muitos dos métodos de ligação covalente de enzimas em suportes inorgânicos envolvem a utilização de derivados do silano contendo um grupo orgânico funcional (método de silanização). Em alguns casos os suportes silanizados podem reagir diretamente com as enzimas, mas na maioria dos casos, estes grupos funcionais devem ser modificados para produzir intermediários reativos, sendo que o reagente mais utilizado é o glutaraldeído devido à simplicidade do método e obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis (ZANIN, 1989).

Na etapa de silanização do suporte ocorre a condensação do resíduo etoxi do silano com o grupo hidroxila da superfície do suporte (vidro, sílica, etc.), produzindo um derivado alquilamino. A ativação com glutaraldeído envolve a reação de formação da base de Schiff, que origina um intermediário ativo (aldeído ativo). Em seguida, o grupo aldeído do suporte ativado é contactado com a solução de enzima, sendo que a ligação ocorre, provavelmente, entre o grupo amino da enzima (ZANIN, 1989).

A reação de ativação do suporte, normalmente, é realizada em pH 7,0 para evitar a polimerização do aldeído próxima à superfície do suporte com carga positiva. Após a ativação a lavagem do suporte com água destilada tem a função de remover o excesso de glutaraldeído e impedir a polimerização do glutaraldeído em excesso com a enzima. Por outro lado, a reação entre o suporte silanizado e a enzima pode ser conduzida em pH entre 3 e 7, pois nesta faixa a atividade da enzima imobilizada praticamente independe do pH em que foi realizada a imobilização (ZANIN, 1989).

## **2.4 - REATORES PARA ENZIMAS IMOBILIZADAS**

Nesta seção serão analisados e comparados os tipos de reatores mais frequentemente utilizados nos trabalhos com enzimas imobilizadas.

Das inúmeras aplicações possíveis para as enzimas imobilizadas, sua utilização industrial é, presumivelmente, a mais importante e conseqüentemente a mais discutida. Em processos industriais, a utilização das enzimas é realizada em reatores químicos, muitas vezes similares aos utilizados em catálise heterogênea.

O reator enzimático deve dar condições para que a enzima e o substrato permaneçam em contato por um tempo suficiente para que a reação ocorra, e no final possibilite a fácil separação entre enzima e produtos.

Os reatores são classificados como homogêneos ou heterogêneos, de acordo com seu conteúdo. Nos homogêneos está presente uma única fase, enquanto nos heterogêneos mais de uma fase está presente, como por exemplo, uma fase líquida contínua (substrato) e uma fase sólida descontínua (enzima imobilizada). Outra classificação possível é quanto à forma de operação: descontínua (batelada) ou contínua. Quanto ao grau de mistura que ocorre no reator, têm-se dois tipos ideais extremos: o de mistura perfeita e o de escoamento tubular, sendo que o perfil de concentração dentro dos diferentes tipos de reatores pode variar apreciavelmente. Uma classificação dos reatores levando-se em consideração o tipo de operação e as características hidrodinâmicas é apresentada na tabela 2.8 (ZANIN, 1989).

Tabela 2.8 - Classificação dos reatores enzimáticos

<b>Modo de Operação</b>	<b>Características Hidrodinâmicas</b>	<b>Tipo de Reator</b>
Descontínuo	Mistura ideal	reator descontínuo com agitação
	Tipo tubular	reator descontínuo com recirculação
Contínuo	Mistura ideal	reator contínuo com agitação reator contínuo com agitação e com uma membrana de ultrafiltração
	Tipo tubular	reator de leito fixo reator de leito fluidizado reator tubular reator de fibras

#### 2.4.1 - REATOR DE LEITO FLUIDIZADO

Se num reator que contém um leito de partículas sólidas o fluido reagente escoar no sentido vertical ascendente com pequena velocidade, as partículas repousam umas sobre as outras como no reator de leito fixo.

À medida que se aumenta a velocidade do fluido atinge-se um ponto no qual a queda de pressão no leito multiplicada pela área transversal da coluna torna-se igual ao peso das partículas. Neste ponto as partículas se separam lentamente e começam a se movimentar; é o início da fluidização. O leito toma a aparência de um líquido em ebulição suave e apresenta propriedades características dos líquidos.

Aumentando-se gradativamente a vazão do fluido, a separação das partículas torna-se mais pronunciada; por isso o leito se expande e o movimento das partículas torna-se mais intenso.

Eventualmente atinge-se uma vazão tal que as partículas são arrastadas com o fluido, determinando o que se conhece por velocidade terminal das partículas.

A diferença de densidade entre o líquido e o sólido (para um mesmo tamanho de partículas) é um dos fatores importantes no desempenho do reator de leito fluidizado, pois à medida que esta é aumentada decresce a qualidade da fluidização. Uma maior diferença de densidade entre o líquido e o sólido permite a utilização de maiores velocidades de fluidização, sem que seja excedida a velocidade terminal das partículas. Isto permite o processamento de maior volume de reação em menor tempo. Porém, uma grande diferença entre as densidades tende a diminuir a qualidade de fluidização devendo haver portanto, um certo compromisso entre essas variáveis (ZANIN, 1989).

O reator de leito fluidizado é preferencialmente utilizado quando a solução de substrato é viscosa ou contém partículas em suspensão, pois possibilita a obtenção de conversão maior do que a obtida no reator contínuo com agitação, além de não apresentar os problemas de obstrução e alta queda de pressão normalmente presentes no leito fixo.

O reator de leito fluidizado, além de reunir a maioria das vantagens do reator de leito fixo, apresenta outras vantagens inerentes à sua natureza, por exemplo, o fato das partículas de sólido estarem em contínuo movimento promove uma distribuição de temperatura mais uniforme, além de favorecer a transferência de massa entre o fluido e a partícula.

#### **2.4.2 - FLUIDIZAÇÃO LÍQUIDO-SÓLIDO**

A fluidização de partículas sólidas por um líquido, que por muito tempo foi considerada como uma curiosidade científica, está se tornando muito importante, principalmente, do ponto de vista industrial. Novos processos estão sendo desenvolvidos, como na hidrometalurgia, tecnologia de alimentos, bioquímica, tratamento de rejeitos industriais, etc. As operações envolvidas podem ser cristalização, lixiviação, troca iônica, adsorção, catálise enzimática e cultura de células.

Neste ítem abordar-se-á a estrutura hidrodinâmica do leito fluidizado líquido-sólido.

### 2.4.2.1 - DESVIOS DA IDEALIDADE

Na fluidização de partículas sólidas por líquido, podem ser notados alguns desvios do escoamento tubular ideal, sendo os principais: canalizações (caminhos preferenciais) e formação de regiões de alta porosidade (“parvoids”).

As canalizações caracterizam-se pelo movimento organizado dos sólidos em determinadas regiões, ascendente e descendente. Naturalmente, próximo ao fundo do leito ou à superfície superior, o escoamento horizontal conecta os dois fluxos. Estudos experimentais demonstraram que a formação de caminhos preferenciais está associada a uma distribuição ineficiente do líquido na base do leito. Nos pontos onde a velocidade do líquido é alta os sólidos se movimentam para cima, e onde a velocidade do líquido é menor, o movimento dos sólidos é descendente. Este fenômeno pode ser evitado pela utilização de uma seção de homogeneização e por um distribuidor que produz um perfil de velocidade uniforme (ZANIN, 1989).

A formação de camadas de baixa densidade, é comumente observada no leito fluidizado líquido-sólido. Estas regiões horizontais de alta porosidade têm aproximadamente 1 cm de espessura; elas são formadas nas proximidades do distribuidor, no fundo do leito, e propagam-se para a superfície superior onde evanescem. Dependendo da vazão, uma região destas pode ocupar toda a seção transversal da coluna ou somente parte dela. Este fenômeno não tem sua origem na distribuição do fluido, mas constitui uma instabilidade natural do leito fluidizado que não pode ser evitada. Parte da mistura dos sólidos no leito fluidizado, provavelmente é devida à propagação dessas regiões de alta porosidade. Com baixas velocidades, pode-se observar uma onda de movimento plana e as partículas sólidas parecem permanecer estacionárias num mesmo nível, somente oscilando quando a onda passa. Para velocidades maiores, o extrato horizontal perde sua estrutura formando regiões menores, que podem coalescer. Em condições de maior turbulência, as partículas movimentam-se aleatoriamente dentro do leito (ZANIN, 1989).

### 2.4.2.2 - EXPANSÃO DO LEITO

A análise experimental da relação velocidade-porosidade envolve a medida da altura do leito fluidizado, e em seguida o cálculo da porosidade ( $\epsilon$ ) pela equação 2.1.

$$\epsilon = (V_t - V_s) / V_t = 1 - M_s / (\rho_P \cdot A_R \cdot H) \quad (2.1)$$

onde:

$A_R$  - área da seção reta do reator ( $\text{cm}^2$ )

$H$  - altura do leito de partículas (cm)

$M_s$  - massa de sólido (g)

$V_s$  - volume da matriz porosa ( $\text{cm}^3$ )

$V_t$  - volume total do reator ( $V_t = A_R \cdot H$ ) em  $\text{cm}^3$

$\varepsilon$  - porosidade do leito

$\rho_P$  - densidade da partícula ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )

Resultados experimentais demonstraram que a relação velocidade-porosidade para o leito fluidizado sólido-líquido depende mais da massa total de partículas sólidas quando a razão diâmetro da coluna ( $d_i$ ) / diâmetro da partícula ( $d_p$ ) é maior que 10-20. Em um gráfico logarítmico esta relação é aproximadamente linear.

Alguns pesquisadores desenvolveram equações que relacionam a razão da velocidade do fluido ( $u$ ) pela velocidade terminal ( $u_{tc}$ ) de uma única partícula com a porosidade do leito. O primeiro trabalho nesta linha foi o de RICHARDSON & ZAKI, (1954), que obteve para a expansão de leitos com partículas esféricas de diâmetro uniforme, as equações 2.2 e 2.3, que são as mais empregadas.

$$(u / u_{tc}) = \varepsilon^n \quad (2.2)$$

$$\text{Log } u_{tc} = \text{log } u_t - dp / di \quad (2.3)$$

onde:

$d_i$  - diâmetro interno do reator (cm)

$d_p$  - diâmetro da partícula sólida (cm)

$n$  - coeficiente de expansão

$u$  - velocidade superficial do fluido (cm/s)

$u_t$  - velocidade terminal da partícula (cm/s)

$u_{tc}$  - velocidade terminal corrigida da partícula (cm/s)

O coeficiente de expansão e a velocidade terminal da partícula, para partículas esféricas, podem ser calculados a partir, por exemplo, das equações apresentadas, respectivamente, por RICHARDSON & ZAKI (1954) e KUNII & LEVENSPIEL (1969).

$$n = 4,65 + 20 dp / di \quad Re_p < 0,2 \quad (2.4)$$

$$n = (4,4 + 18 dp / di) Re_p^{-0,03} \quad 0,2 < Re_p < 1,0 \quad (2.5)$$

$$n = (4,45 + 18 dp / di) Re_p^{-0,1} \quad 1,0 < Re_p < 200 \quad (2.6)$$

$$u_t = g(\rho_{ap} - \rho) dp^2 / (18\mu) \quad Re_p < 0,4 \quad (2.7)$$

$$u_t = [4g^2 (\rho_{ap} - \rho)^2 / (225\rho\mu)]^{1/3} dp \quad 0,4 < Re_p < 500 \quad (2.8)$$

onde:

$g$  - aceleração gravitacional ( $cm/s^2$ )

$Re_p$  - número de Reynolds da partícula ( $Re_p = \rho \cdot dp \cdot u_t / \mu$ )

$\mu$  - viscosidade do líquido ( $g/cm \cdot s$ )

$\rho$  - densidade do líquido ( $g/cm^3$ )

$\rho_{ap} = (1 - \varepsilon_p) \rho_s + \varepsilon_p \rho$  = densidade úmida da partícula ( $g/cm^3$ )

$\rho_s$  – densidade cristalina da partícula ( $g/cm^3$ )

$\varepsilon_p$  – porosidade interna da partícula

### 2.4.2.3 - VELOCIDADE MÍNIMA DE FLUIDIZAÇÃO

O início da fluidização representa a transição entre o estado fixo e fluidizado, sendo que a velocidade mínima de fluidização ( $u_{mf}$ ) correspondente a este ponto é sensível à forma, tamanho e densidade da partícula (ZANIN, 1989).

Para propósitos de projeto é importante poder-se calcular a velocidade mínima de fluidização. Esta pode ser obtida a partir de :

- i) equações que relacionam a queda de pressão do leito fixo com a velocidade do líquido;
- ii) equações de porosidade-velocidade;
- iii) equações empíricas.

No ponto de transição, o leito pode ser considerado tanto fixo como fluidizado. Portanto, é possível utilizar uma equação que permite o cálculo da queda de pressão do leito fixo ( $\Delta P$ ), sendo que a mais utilizada é a de Ergun, ou seja, equação 2.9 (ZANIN, 1989).

$$(\Delta P / L) = 150 [(1 - \epsilon)^2 u \mu / (\epsilon^3 \psi^2 dp^2)] + 1,75 [(1 - \epsilon) \rho u^2 / (\epsilon^3 \psi dp)] \quad (2.9)$$

que para  $Re_p < 20$  pode ser simplificada para a equação 2.10 (KUNII & LEVENSPIEL, 1969).

$$u_{mf} = (\psi dp)^2 (\rho_{ap} - \rho) g \epsilon_{mf}^3 / [150 \mu (1 - \epsilon_{mf})] \quad (2.10)$$

onde:

L – comprimento do leito fixo

$\epsilon_{mf}$  - porosidade na condição de mínima fluidização

$\psi$  - fator de forma ( $\psi = 1$  para esferas).

Para o cálculo da velocidade mínima de fluidização também pode ser utilizada a equação de Carman – Kozeny, ou seja, a equação 2.11 (KUNNI & LEVENSPIEL, 1969).

$$u_{mf} = 0,00059 dp^2 (\rho_{ap} - \rho) g / \mu \quad Re_p < 20 \quad (2.11)$$

Courdec (1985), citado por ZANIN (1989), apresenta uma extensa revisão das equações disponíveis para o cálculo da expansão do leito e da velocidade mínima de fluidização para diferentes tipos de partículas.

## 2.5 - PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS

A ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) sobre um meio contendo amido ou outros carboidratos correlatos conduz à formação das ciclodextrinas. Os produtos primários resultantes da quebra da estrutura helicoidal do amido são submetidos à uma reação intramolecular e produtos cíclicos, contendo as ligações  $\alpha$ -1,4, são formados. A razão de CDs produzidas dependerá não só da origem da CGTase, como também do tempo de incubação da enzima sobre o meio contendo amido, pois muitas enzimas CGTase produzem inicialmente a  $\alpha$ -CD, enquanto as CDs maiores são formadas mais lentamente (BEKERS et al., 1991).

As principais fases envolvidas na produção da CDs são: (i) cultivo do microorganismo produtor da CGTase; (ii) separação da enzima do meio seguido de sua concentração e purificação; (iii) conversão enzimática do amido pré-hidrolisado em uma mistura de dextrinas cíclicas e acíclicas; e, (iv) separação das CDs do meio reacional e

sua posterior purificação e cristalização (SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991; FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

Há dois diferentes métodos para a produção comercial de CDs. Um deles envolve a conversão do amido gelatinizado pela atuação da CGTase e o outro a conversão do amido liqüefeito, na presença de solventes orgânicos, tais como 1-decanol (para  $\alpha$ -CD), tolueno e ciclohexano (para  $\beta$ -CD) e ciclododecanona (para  $\gamma$ -CD). Industrialmente os solventes orgânicos são empregados na produção de  $\beta$ -CD. Os complexantes para  $\alpha$ -CD tem alto ponto de ebulição, o que torna difícil sua remoção dos sistemas aquosos por evaporação. Os complexantes para  $\gamma$ -CD são muito caros para o uso comercial. As desvantagens em se utilizar o processo de conversão na presença de solventes orgânicos são a toxidez desses solventes, sua inflamabilidade e dificuldade de recuperação. Uma das maiores vantagens é que permite a obtenção de CDs no estado sólido e que essas acumulam durante a conversão na forma de complexos cristalinos insolúveis, permitindo-se assim a sua fácil separação da mistura reacional, por centrifugação ou filtração. Já nos processos sem o uso de solventes, o maior problema é a separação das CDs do amido não convertido. Isso conduz à utilização de processos sofisticados de separação, tais como, fracionamento por ultrafiltração, adsorção em resinas sintéticas e separação por membranas (AMBRUSTER, 1988; PEDERSEN, 1995).

O processamento de amido em concentrações de interesse industrial, requer uma etapa inicial de liqüefação, o que é feito a uma temperatura entre 105-110°C. Quando se utiliza  $\alpha$ -amilases, os produtos da reação são maltodextrinas de cadeia curta, que podem atuar como receptores na reação de acoplamento, reduzindo-se assim o rendimento de CDs. Entretanto, a produção de oligossacarídeos de baixo peso molecular é possível quando o amido é liqüefeito com  $\alpha$ -amilase e CGTase é adicionada após a liquefação. A liquefação com CGTase tornou-se possível em 1985, quando foi isolada uma CGTase de uma bactéria termofílica, a *Thermoanaerobacter*, estável em temperaturas acima de 100°C e ativa em baixos pH (importante para prevenir a formação de subprodutos) (NORMAN & JORGENSEN, 1992; PEDERSEN et al., 1995).

A tabela 2.9 apresenta alguns artigos e patentes sobre as fases de produção das CDs, particularmente da  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD. As principais conclusões que se pode tirar dessa ampla revisão sobre a produção de ciclodextrinas são (SZEJTILI, 1988):

- i) Alta concentração de substrato resulta em menores custos de operação, porém em menores rendimentos;

- ii) Ao se trabalhar com altas concentrações de amido, há a necessidade de se reduzir a viscosidade da solução por pré-hidrólise (usando-se  $\alpha$ -amilase com pequena quantidade de CGTase ou ácidos), ou desintegração mecânica;

Tabela 2.9 - Métodos e patentes sobre produção de ciclodextrinas (SZEJTLI, 1988)

Patente	Conc.Amido	Pré-Hidrólise	Agente complexante	Produto Principal
Armbruster et al., 1969	Batata, 30%	Amilase	Tolueno	$\beta$ -CD
Armbruster et al., 1972	Batata, 30%	$\alpha$ -amilase	1-decanol, 1-butanol	$\beta$ -CD
Hayashibara et al., 1973	Amido solúvel 10%		Tricloroetileno	$\beta$ -CD
Sato et al., 1974	5-30%	Amilase ou ácido oxálico	Tricloroetileno	Mistura
Horikoshi et al., 1974	Batata, 10%	NaOH		Mistura
Kobayashi et al., 1977	Batata, 5%		Lauril sulfato de sódio	$\alpha$ -CD
Vakaliu et al., 1979	Milho, 33%	$\alpha$ -amilase	Tolueno	$\beta$ -CD
Rikagaku Kenkyushu et al. 1980	Batata, 4%	CGTase	Hidrólise pela glicoamilase ou troca iônica	$\alpha$ -, $\beta$ - ou $\gamma$ -CD
Toyo Jozo, 1980	Batata, 25%		álcool alifático	Mistura

- iii) A razão das CDs produzidas dependerá do tempo de conversão, sendo também muito influenciada pelas condições de reação, especialmente a adição de complexantes;
- iv) Na ausência de complexantes orgânicos forma-se uma mistura de CDs com baixo rendimento (menos de 20% de conversão do amido, sob condições industriais) e grande quantidade de subprodutos acíclicos;
- v) A produção de uma mistura de CDs e sua posterior separação não é viável economicamente para a escala industrial;
- vi) Conversão controlada, somente pelo uso de complexantes, produz quase que exclusivamente uma CD;

- vii) Ao se usar complexantes orgânicos, deve-se controlar o conteúdo residual no produto final para que esse fique dentro dos níveis permitidos;
- viii) A aplicação da enzima desramificadora pullulanase aumenta o rendimento de CDs em 4 - 6%.
- ix) A quantidade presente de glicose e maltose na reação não deve exceder a 5% do amido, pois o rendimento em ciclodextrinas reduz para aproximadamente 15% quando a quantidade de glicose e maltose excede a 20%. Em condições normais o rendimento fica entre 30 e 70%.

O rendimento em ciclodextrinas é extremamente dependente do grau de pré-hidrólise do amido, ou seja, hidrólise excessiva reduz o rendimento total em ciclodextrinas. Por exemplo, o rendimento em ciclodextrinas de uma solução de amido hidrolisado (DE=1) 34 g/100 mL, após 4 dias de reação a 34°C e na presença de tricloroetileno, foi de 45%, enquanto para uma DE=12 o rendimento foi de apenas 17% (SZEJTLI, 1988).

Não há nenhuma CGTase específica para a produção exclusiva de  $\alpha$ -, $\beta$ - ou  $\gamma$ -CD. CGTase do *Bacillus macerans* e *Klebsiella pneumoniae* produzem principalmente  $\alpha$ -ciclodextrina, enquanto a CGTase do *Bacillus alcalofílico* nº 38-2 produz principalmente  $\beta$ -ciclodextrina. A razão da CDs produzidas está diretamente ligada com as condições da reação. Segundo SZEJTLI (1988), em 1955, Cramer & Steinle observaram que na presença de tolueno o rendimento de  $\beta$ -CD aumentava continuamente, enquanto o rendimento de  $\alpha$ -CD, após atingir seu máximo, decrescia bruscamente. Na ausência de tolueno, o produto principal era a  $\alpha$ -CD, com pequenas quantidades de  $\beta$ -CD. Com a CGTase do *Bacillus macerans*, Suzuki et al., em 1975, obtiveram na presença de tricloroetileno, um rendimento de 51,2% de  $\beta$ -CD, com alguns traços de  $\alpha$ -CD. Na presença de 1-decanol a conversão foi de 35,9% para  $\alpha$ -CD e apenas de 3,1% para  $\beta$ -CD.

HORIKOSHI (1979), utilizando a CGTase do *Bacillus macerans* nº 38-2 produziu CD a partir de uma suspensão de amido de batata 1%, com rendimentos superiores a 80%. Em seus trabalhos observou que melhores rendimentos eram obtidos com soluções de amido mais diluídas. Mas, como o amido é um substrato barato, o uso em escala industrial de soluções com maiores concentrações têm a vantagem de reduzir os volumes reacionais e facilitar a concentração do hidrolisado. Em seus trabalhos, Horikoshi concluiu que para a escala industrial, a concentração ótima de substrato seria 15%.

BERGSMA et al. (1988) verificaram em seus estudos com a CGTase do *Bacillus circulans* que a conversão do amido de batata gelatinizado em  $\beta$ -CD era influenciado pela

concentração do substrato. Utilizando suspensão de amido de batata 2,3% obteve 43% de conversão, decrescendo para 19% ao se utilizar uma concentração 22,6%. Esse baixo rendimento em altas concentrações de amido deve-se à forte, mas reversível, inibição da CGTase pela  $\beta$ -CD e em menor extensão pela  $\alpha$ -CD e  $\gamma$ -CD. Removendo a  $\beta$ -CD da mistura reacional pela formação de complexos de inclusão ou por ultrafiltração pode-se obter melhores conversões em altas concentrações de substrato. BERGSMA et al. obtiveram um rendimento de 50%, removendo a  $\beta$ -CD do meio reacional pela sua complexação com benzoato de sódio, utilizando o mesmo substrato a 22%.

### 2.5.1 - PRODUÇÃO DE $\beta$ -CD

Em 1969, a CORN PRODUCTS INTERNATIONAL Co. produziu  $\beta$ -CD usando a CGTase do *Bacillus macerans*. A companhia TEIJIN no Japão também produziu  $\beta$ -CD numa planta piloto. Os problemas encontrados por essas companhias foram: a CGTase do *Bacillus macerans* não era disponível para o uso industrial devido à dificuldade de sua produção, além de não serem termoestáveis; baixo rendimento de conversão a partir do amido, ou seja, 20 a 30%; e, a utilização de solventes orgânicos, usados para precipitar a CD, tinha a desvantagem de elevar o preço da CD produzida, além da proibição de serem utilizados em processamento de alimentos (HORIKOSHI, 1979).

Na produção industrial de  $\beta$ -CD são utilizados dois métodos: (i) conversão não controlada, com sacarificação do amido não convertido pela atuação da glicoamilase, e (ii) conversão controlada, utilizando tolueno como complexante (SZEJTLI, 1988). Na linguagem de Szejtli, "controlada" refere-se à presença de um solvente orgânico, o qual servirá como agente precipitante da  $\beta$ -CD.

Um processo não controlado típico, usado no Japão, consiste nas seguintes etapas (HORIKOSHI, 1979; SZEJTI, 1988):

- i) Liqüefação de uma suspensão de amido de batata a 15%, contendo 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , pela atuação da CGTase do *Bacillus* n<sup>o</sup> 38-2 a 85-90°C e pH 8,5;
- ii) Conversão contínua a 60°C por 30 horas;
- iii) Hidrólise do amido não convertido, utilizando a  $\alpha$ -amilase e um pH de 5,5 – 5,7.
- iv) Clarificação da mistura reacional utilizando carvão ativo e filtração;
- v) Remoção dos íons do filtrado em resina de troca iônica, concentração do filtrado sob pressão reduzida e cristalização da  $\beta$ -CD por resfriamento;
- vi) Separação da  $\beta$ -CD por centrifugação e posterior recristalização, dando um rendimento em torno de 18-24%.

Um processo controlado típico usado na Hungria envolve as seguintes etapas (SZEJTLI, 1988):

- i) Ajuste do pH de uma suspensão de amido de milho 33% p/p para 6,2 com ácido clorídrico 10%, seguido de novo ajuste para 7,2 com hidróxido de cálcio 10%;
- ii) Hidrólise parcial do amido pela  $\alpha$ -amilase do *Bacillus subtilis*, por 10 min a 80°C;
- iii) Aquecimento da mistura por 30 min a 120°C, para inativação da enzima e dissolução do amido;
- iv) Resfriamento da suspensão de amido para 50°C e adição de 50 Unidades/mL de CGTase
- v) Após 30 minutos e resfriamento para 45°C é adicionado tolueno a 5% v/v, seguindo-se a conversão por 105 horas, sob agitação;
- vi) Separação do complexo  $\beta$ -CD-tolueno por filtração e recuperação do tolueno por destilação a vácuo;
- vii) Recuperação da  $\beta$ -CD por concentração da solução, filtração e cristalização. Obtêm-se  $\beta$ -CD com 99,7% de pureza.

### 2.5.2 - PRODUÇÃO DE $\alpha$ -CD

A separação de  $\alpha$ -CD da mistura reacional do processo de conversão não controlado, por precipitação ou por cromatografia é muito caro sob o ponto de vista industrial. A concentração de equilíbrio da  $\alpha$ -CD é muito baixa, sob condições normais de conversão enzimática de amido de batata. Sua concentração não é mais do que 13,5 g/L, o que representa menos de um décimo de sua solubilidade a 25°C. A produção de  $\alpha$ -CD só é viável economicamente por conversão controlada, utilizando-se complexantes apropriados, tal como o decanol, pois com esse complexante a  $\alpha$ -CD é obtida na forma cristalina e as quantidades de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD são desprezíveis. O rendimento pode atingir 50% e é independente do tipo de amido utilizado. Uma mistura de metil-etil-cetona e detergente aniônico também é apropriada para a conversão controlada. A  $\alpha$ -CD permanece em solução, e após a hidrólise do amido não convertido pela  $\alpha$ -amilase, pode ser precipitada com ciclohexano. O rendimento total em  $\alpha$ -CD é de 20-25%, dependendo do tipo de amido utilizado (SZEJTLI, 1988).

TSUCHIYAMA et al. (1991) produziram  $\alpha$ -CD a partir de uma solução de amido de batata 8,3%, pela atuação da CGTase do *Bacillus macerans*, utilizando um sistema no

qual a  $\alpha$ -CD era separada do meio reacional usando um adsorvente específico. Após a conversão do amido, a solução passava por uma coluna recheada com um adsorvente específico para  $\alpha$ -CD (quitosana, com ácido esteárico como ligante), ficando retida neste adsorvente. A  $\alpha$ -CD era facilmente eluída com água quente, resultando num produto de alta pureza (aproximadamente 95%). Conseguiram um rendimento de 22,2% de  $\alpha$ -CD.

### 2.5.3 - PRODUÇÃO DE $\gamma$ CD

A  $\gamma$ -CD pode ser obtida por processos de conversão controlada ou não controlada. A solução “mãe” da produção de  $\beta$ -CD por conversão não controlada contém aproximadamente 8% de  $\gamma$ -CD, 7% de  $\beta$ -CD e 3% de  $\alpha$ -CD, além de glicose, maltose e outros oligossacarídeos. Após a hidrólise das dextrinas acíclicas pela glicamilase, essa solução é passada numa coluna de troca aniônica e as frações eluídas entre dextrinas de pesos moleculares maiores e  $\alpha$ - +  $\beta$ -CD conterão a  $\gamma$ -CD, que pode ser obtida por cristalização, após concentração da solução para 40-45%, com um grau de pureza de aproximadamente 98,5%. Rendimentos melhores podem ser obtidos utilizando-se complexantes apropriados, tais como metil-etil-cetona e  $\alpha$ -naftol, os quais formam complexos estáveis com a  $\gamma$ -CD. Esse complexo pode ser removido por filtração e a  $\gamma$ -CD pode ser obtida por evaporação, com rendimentos acima de 20% (SZEJTLI, 1988).

As aplicações da  $\gamma$ -CD na química farmacêutica são muito promissoras, mas infelizmente uma grande parte do seu potencial não é aproveitado devido ao seu alto preço, além de ter limitações de uso para propósitos médicos, pois devem estar isentas de precipitantes orgânicos. Os métodos mais utilizados para a obtenção da  $\gamma$ -CD são: filtração em gel e adsorção em resinas sintéticas. MATTSON et al. (1988) propuseram a cromatografia de afinidade como método para o isolamento e purificação da  $\gamma$ -CD a partir da mistura reacional de produção da  $\beta$ -CD. A recuperação da  $\gamma$ -CD foi de 80-85%, com 100% de pureza.

## 2.6 - IMOBILIZAÇÃO DA CGTase E SUA UTILIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS

Os métodos convencionais de produção de ciclodextrinas propostos até 1976 eram satisfatórios apenas para escala laboratorial ou semi-industrial. Todos esses métodos utilizavam baixa concentração de substrato e precipitantes orgânicos, o que os tornavam inviáveis para a produção em grande escala. Com a descoberta, em 1975 por

Nakamura & Horikoshi, do *Bacillus alcalofílico* sp. Nº 38-2, cuja CGTase isolada a partir desse microorganismo produzia CDs com maiores rendimentos, começaram a ser desenvolvidos processos de produção industrial de CDs. A técnica de imobilização de enzimas está se desenvolvendo rapidamente e sua utilização na produção de CDs apresenta dentre outras vantagens, a fácil recuperação da enzima, maiores rendimentos de CDs e desenvolvimento de processos de produção contínua (SU & YANG, 1990).

Muitas investigações sobre a preparação de CGTase imobilizada (ICGTase) têm sido publicadas. Hashimoto et al. reportaram a imobilização da CGTase usando resina porosa IRA-93 E HN-11-22 e sua utilização na produção contínua de CDs (YANG & SU, 1989).

NAKAMURA & HORIKOSHI (1977) imobilizaram a CGTase do *Bacillus alcalofílico* sp. por adsorção em copolímero de vinilpiridina. Conseguiram a imobilização de 25% da atividade total oferecida. As condições ótimas para a atividade enzimática desta enzima foram pH 6 – 8 e 55°C. Na produção de CDs a partir de uma suspensão de amido de batata 15%, sob as condições de pH 8 e 55°C, esta enzima converteu 46% do amido em CDs.

SZEJTLI (1988) reportou a imobilização da CGTase do *Bacillus alcalofílico* nº 38-2 em copolímero de vinilpiridina ativado, apresentando um rendimento em atividade de 26%, com mudança do pH ótimo de 4,5 – 5,0 para 5,5 – 6,0 e da temperatura ótima de 50°C para 55°C. Essa enzima imobilizada converteu amido em ciclodextrinas sem perda de atividade após seu uso em 4 operações batelada. Uma operação contínua a 50°C e pH 8, utilizando-se solução de amido 4%, converteu 63% de amido em ciclodextrinas por um período de 2 semanas.

A CGTase do *Bacillus stearothermophilus* foi succinilada e adsorvida em resina Diaion HP-30. O rendimento em atividade foi de 77% e o tempo de meia-vida de aproximadamente 800 horas a 50°C (SZEJTLI, 1988).

A CGTase do *Bacillus macerans*, após ativação por carbodiimida, foi imobilizada em celulose ou derivados de dextranas, tais como, copolímero de ácido acrílico ou acrilamida. A atividade da enzima imobilizada em celulose foi de 26,5 Unidades Kitahata/g e da enzima imobilizada em poliacrilamida de 230 – 450 Unidades Kitahata/g. O pH ótimo sofreu alteração de 5,9 para 5,0 e a temperatura ótima cobriu uma faixa de 40 a 60°C, enquanto para a enzima livre o pico de temperatura ótima era em torno de 60°C (SZEJTLI, 1988).

CRUMP & ROZZELL (1988) imobilizaram CGTases do *Bacillus macerans* e *Bacillus* sp. de várias fontes em sílica, utilizando o método da ligação covalente. A

CGTase imobilizada converteu amido hidrolisado e maltodextrinas com baixa DE eficientemente. O rendimento de CDs foi de 50%, e o biocatalisador, quando usado em produção contínua de CDs, demonstrou ter um tempo de meia-vida de 2 meses, na presença de cloreto de cálcio 5 mM e nas temperaturas de 37 e 45°C.

MORAES et al. (1990) imobilizaram a CGTase do *Bacillus alcalophilus* sp 1-1 em sílica de porosidade controlada, pelo método da ligação covalente, usando glutaraldeído como reagente bifuncional. Obtiveram um biocatalisador com 10,74 mg de proteína por g de suporte, imobilizando 9,0% do total da atividade oferecida; com base na atividade experimental da ICGTase (85,74  $\mu$ moles  $\beta$ -CD/min x g de EI), determinada a 50°C, pH 8 e utilizando como substrato dextrina 5 g/L, o rendimento em atividade foi de 27,8%. A conversão de maltodextrina 10% em CDs, nas condições de pH 8 e 50°C, numa operação batelada de 24 horas, utilizando um volume reacional de 100 mL e 0,7792 g de EI (8,37 mg de proteína), foi de 27,3%. Com a CGTase em solução, HAMON & MORAES (1990) obtiveram uma conversão de 14,6%, para uma operação batelada de 24 horas, conduzida a 50°C e pH 8. A atividade enzimática da CGTase era de 100,48  $\mu$ moles  $\beta$ -CD/(min x mg de proteína), determinada a 50°C, pH 8 e dextrina 5 g/L como substrato. A conversão foi determinada a partir de 100 mL de uma solução de dextrina 10%, com uma carga enzimática no reator de 1,16 mg de proteína. O produto principal, para a produção de CDs com a enzima imobilizada, foi a  $\beta$ -CD (23,4 g/L  $\beta$ -CD e 3,4 g/L  $\gamma$ -CD) representando 87,6% do total de CDs. Com a enzima livre a  $\beta$ -CD representava 77,8% do total de CDs, sendo sua produção igual a 11,1 g/L de  $\beta$ -CD e 3,2 g/L de  $\gamma$ -CD.

SAKAI et al. (1991), imobilizaram a CGTase do *Bacillus stearothermophilus* em resina hidrofílica macroreticular (FE-4611), com diâmetro das partículas igual a 0,4 mm e tamanho de poros igual a 650 Å, contendo uma amina primária como grupo ativo. Utilizaram o método de ligação covalente, usando glutaraldeído como reagente bifuncional. A enzima imobilizada apresentou um ótimo em atividade na temperatura de 60°C e o pH ótimo se estendeu desde pH 6 (ótimo da enzima livre) até pH 8. Produziram glicosil-CDs ( $G_1$ -CDs) a partir de dextrinas ramificadas, com 80% de pureza, usando a enzima imobilizada em um reator contínuo em escala piloto. A conversão de dextrinas ramificadas em  $G_1$ -CDs foi de 10%, para uma operação de 70 dias.

HISAMATSU & YAMADA (1989) imobilizaram a pullulanase do *Bacillus acidopullulyticus* em quitina deacetilada (PDAC-35) pelo método da ligação covalente, usando glutaraldeído como reagente de ligação cruzada. Aproximadamente 90% da pullulanase usada foi imobilizada no suporte. A enzima imobilizada foi utilizada na produção de maltosil- $\beta$ -CD em uma coluna de vidro recheada com o biocatalisador a

partir de uma solução de  $\beta$ -CD e maltose. As condições para reação foram pH 3,75 e temperatura igual a 56°C. A pullulanase imobilizada produziu maltosil- $\beta$ -CD, dimaltosil- $\beta$ -CD e maltosil-maltose tão bem quanto a enzima livre, retendo quase toda a atividade inicial. A conversão de  $\beta$ -CD em CDs ramificadas foi de aproximadamente 50%, enquanto com a enzima livre era 35%.

YANG & SU (1989) imobilizaram a CGTase do *Bacillus alcalofílico* sp. em quitosana usando o método da ligação covalente, com glutaraldeído como reagente de ligação cruzada. Essa enzima teve uma atividade ótima em pH 8,5 e 60°C, com uma estabilidade térmica superior à da enzima livre. Após 4 operações batelada de 23 horas, a 55°C e pH 8,5, a CGTase imobilizada (ICGTase) reteve 83% de sua atividade relativa. Numa operação contínua, sob as mesmas condições de reação, a ICGTase teve um tempo de meia-vida de 6 dias. A conversão de amido de batata 5% em CDs foi de 46% (sendo  $\beta$ -CD o produto principal, 34%), aumentando para 58,3% com a adição de etanol 16% à solução de amido.

SU & YANG (1990) utilizando a CGTase do *Bacillus alcalino* sp. imobilizada em quitosana pelo método da ligação covalente, produziram CDs numa operação contínua, com a hidrólise do amido não convertido pela atuação da  $\alpha$ -amilase e da glicoamilase imobilizadas, respectivamente em quitosana e gel de alginato de cálcio. O rendimento de CDs foi de 70%, a partir de uma solução de amido 1% e nas condições ótimas de 40°C e pH 4,5. A hidrólise do amido não convertido foi muito eficiente, pois aproximadamente 98% dos oligossacarídeos foram convertidos a glicose. O produto principal ciclizado a partir desta CGTase foi a  $\beta$ -CD (59,2%) separada da mistura reacional por precipitação, após concentração por evaporação.

A CGTase do *Bacillus macerans*, parcialmente purificada por filtração em gel Sephadex G-75, foi covalentemente ligada em vidro poroso esférico (Trisoperl), tratado com  $\gamma$ -aminopropiltriétoxissilano e ativado com glutaraldeído, por STEIGHARDT & KLEINE (1993). Por este método foram imobilizadas 3,5 – 4 mg de proteína/g de suporte, apresentando um rendimento em atividade de 25%. O pH e a temperatura ótima da ICGTase foram 5,1 e 48°C, respectivamente. A conversão descontínua de amido em  $\beta$ -CD pela ICGTase foi tão eficiente quanto pela enzima em solução, numa operação de 24 horas, apresentando um rendimento de CDs de aproximadamente 58%. Após a utilização da ICGTase por 20 vezes, a enzima ainda apresentou 65% de atividade residual.

Na tabela 2.10 apresenta-se um resumo sobre a imobilização de CGTase.

Tabela 2.10 - Imobilização da enzima CGTase

Origem da CGTase	Imobilização				Produção de CDs			Fonte
	Método de ligação	Suporte	mg proteína/g suporte	Atividade fixada (%)	Operação	Substrato	Rendimento em CDs (%)	
<i>B.alcalofílico</i> 38-2		Copolímero vinilpiridina		26	Contínua	Amido	63	SZEJTLI (1988)
<i>B.stearo-thermophilus</i>	Adsorção	Resina Diaion HP-30		77				SZEJTLI (1988)
<i>B.macerans</i>		Celulose ou derivados de dextranas						SZEJTLI (1988)
<i>B.macerans</i> e <i>B. sp.</i>	Covalente	Sílica	30-50		Contínua	Amido hidrolisado e maltodextrina de baixo DE	50	CRUMP & ROZZEL (1988)
<i>B. stearo-thermophilus</i>	Covalente	Resina hidrofílica			Contínua	Dextrinas ramificadas 4%	10	SAKAI et al. (1991)
<i>B. alcalofílico</i> sp.	Covalente	Quitosana	8,3		Contínua	Amido batata 1%	70	YANG & SU (1989)
						Amido batata 5%	46	SU & YANG (1990)
<i>B. macerans</i>	Covalente	Vidro poroso (Trisopearl)	3,5-4,0	25	Batelada 24 horas	Amido solúvel 2,5%	58	STEIGHARDT & KLEINE (1993)
<i>B. alcalofílico</i> sp.	Adsorção	Copolímero vinilpiridina	9,0	25	Batelada 6 h	Amido de batata 15%	46	NAKAMURA & HORIKOSHI (1977)
					Contínua			
<i>B. Alcalofílico</i> sp. 1-1	Covalente	Sílica	10,74	9	Batelada 24 horas	Maltodextrina 10%	27	MORAES et al. (1990)

## 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, apresenta-se os principais materiais e equipamentos, bem como a metodologia empregada no desenvolvimento experimental deste trabalho.

### 3.1 - MATERIAIS

#### 3.1.1 - SUBSTRATO

O substrato empregado foi a Dextrina 10, Artigo 31410, fornecida pela FLUKA CHEMIE AG, com um teor de umidade de 3,3% e peso molecular médio de 1672 g/gmol.

#### 3.1.2 - ENZIMA

A enzima utilizada foi a Ciclodextrina Glicosiltransferase ( CGTase ), originária do *Bacillus alcalofílico* sp e clonada em *Escherichia coli*, fornecida pela WACKER (consortium für elektrochemische Industrie GmbH, Munique), contendo 193,1 mg de proteína/g de enzima liofilizada.

O peso molecular desta enzima é igual a 75000 daltons e sua atividade específica, determinada a 50°C e pH 8 é de 63,1 Unidades/mg de proteína.

Uma Unidade enzimática Internacional é a quantidade de enzima que produz 1  $\mu\text{mol}$  de  $\beta$ -CD por minuto de reação, sob condições especificadas (SEGEL, 1975).

#### 3.1.3 - CICLODEXTRINAS PADRÕES

Nos métodos de dosagem de ciclodextrinas, utilizou-se como padrão:

- a)  $\beta$ -ciclodextrina, fornecida pela SIGMA CHEMICAL CO., com massa molecular de 1135 e umidade de 16,40%
- b)  $\gamma$ -ciclodextrina, fornecida pela WACKER, com massa molecular de 1297,14 e umidade de 10,49%.

### 3.1.4 - REAGENTES ANALÍTICOS

Para as determinações colorimétricas de  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD e proteína, utilizou-se os corantes: fenolftaleína ( VETEC ), sal de sódio de verde de bromocresol ( FLUKA ) e azul brilhante de coomassie G-250 ( FLUKA ), respectivamente.

Utilizou-se como proteína padrão a Albumina de Soro Bovino A-2153 ( SIGMA ), com umidade de 1,6%.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico P.A.

### 3.1.5 - SUPORTES

Na purificação da CGTase por cromatografia de afinidade bioespecífica, empregou-se como matriz na preparação do suporte cromatográfico a Sepharose 6B, adquirida da Pharmacia Fine Chemical Inc.

Para a imobilização da enzima purificada, empregou-se como suporte a Sílica de Porosidade Controlada ( SPC ), fornecida pela Sucrerie Vanciennes, França, possuindo um diâmetro médio de partículas de 0,42 mm e granulometria na faixa de 32/42 mesh (0,589 a 0,351 mm).

### 3.1.6 - REATORES E EQUIPAMENTOS

#### 3.1.6.1 - REATORES

##### 3.1.6.1.1 - Reator batelada tipo cesta ( basket )

O reator mostrado na figura 3.1, foi empregado na determinação da atividade da CGTase imobilizada, sendo constituído de um reator de vidro encamisado, com volume útil de 100 mL, contendo uma cesta ( basket ) usada para o confinamento da enzima imobilizada. Esta cesta foi construída em aço inoxidável, malha 100, com 12 mm de diâmetro e 65 mm de altura.

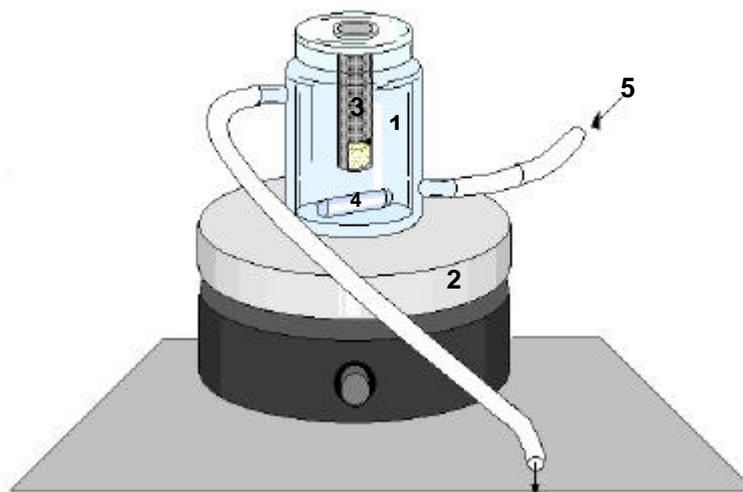


Figura 3.1 - Reator batelada tipo cesta, utilizado na determinação da atividade da enzima CGTase imobilizada; componentes: (1) reator de vidro encamisado; (2) agitador magnético; (3) cesta em aço inoxidável contendo a CGTase imobilizada; (4) barra magnética revestida de Teflon; (5) conexão para circulação de água.

#### 3.1.6.1.2 - Reator de leito fluidizado

O reator mostrado na figura 3.2, foi utilizado na expansão do leito de partículas e na conversão da dextrina em ciclodextrinas em função da carga enzimática, e por isso, consequentemente também função do tempo médio de residência do substrato no reator.

O módulo experimental completo era constituído dos seguintes componentes:

- 1) Coluna de vidro encamisada da PHARMACIA FINE CHEMICALS, com 1 m de comprimento e 16 mm de diâmetro interno
- 2) Reservatório de água de termostatização, construído em aço inoxidável;
- 3) Bomba de circulação de água;
- 4) Bomba peristáltica COLE PARMER INSTRUMENT CO, com cabeçote MOD. 7014 20;
- 5) Controlador, contactor e sensor, para o ajuste da temperatura desejada; e
- 6) Reservatório de substrato.

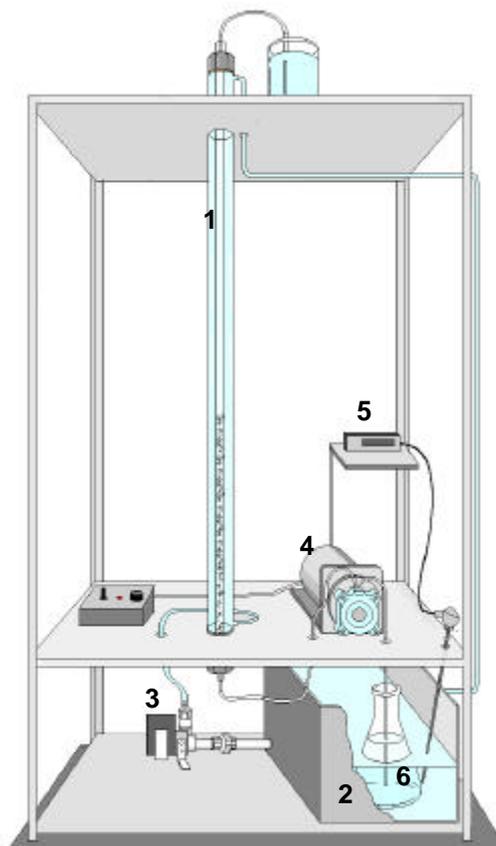


Figura 3.2 - Módulo experimental do reator de leito fluidizado, usado na produção de CDs; componentes: (1) tubo de vidro encamisado; (2) reservatório de água para termostatização do sistema; (3) bomba de circulação de água; (4) bomba peristáltica, usada para controlar a alimentação de substrato no reator; (5) controlador de temperatura da água de circulação; (6) reservatório de substrato.

### 3.1.6.2 - EQUIPAMENTOS

- a) Agitador magnético FANEM MOD. 257;
- b) Agitador de Tubos PHOENIX MOD. AT 56;
- c) Balança semi-analítica METTLER PM400 e balança analítica METTLER AE200;
- d) Banho maria tipo Dubnoff MARCONI, utilizado no preparo do gel bioespecífico e nas diversas etapas de imobilização da CGTase;
- e) Banho termostático TE 184 TECNAL, empregado na purificação e na determinação da atividade da enzima livre e imobilizada;

- f) Bombas de vácuo e peristáltica;
- g) Coletor de frações ADVANTEC, modelo SF2120
- h) Coluna de vidro encamisada, de 1 cm de diâmetro interno e 30 cm de comprimento, utilizada na purificação da CGTase;
- i) Espectrofotômetro UV-VIS UV-1203 SHIMADZU;
- j) Microconcentradores (CENTRICON 30), com membranas de 30000 Da da Amicon e centrífuga FANEM, com velocidade até 5000 rpm, empregados na concentração da solução enzimática purificada;
- k) Peneirador BERFEL e conjunto de peneiras GRANUTEST 20/100 Mesh (0,833 a 0,147 mm), utilizado na determinação granulométrica da SPC; e
- l) pH-metro TEC-2 TECNAL.

## 3.2 - MÉTODOS

### 3.2.1 - DOSAGEM DE CICLODEXTRINAS

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 dessas moléculas, utilizando-se de curvas de calibração, construídas a partir de amostras de concentrações conhecidas.

Na determinação da concentração de  $\beta$ -CD utilizou-se o método colorimétrico da fenolftaleína (PHE), desenvolvido por VIKMON (1981) e modificado por HAMON & MORAES (1990). Este método baseia-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 é proporcional à quantidade 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, como detalhado no anexo 1.

As concentrações de  $\gamma$ -CD foram determinadas utilizando-se o método colorimétrico do verde de bromocresol (BCG), proposto por KATO & HORIKOSHI (1984) e modificado por HAMON & MORAES (1990). O espectro de absorção do BCG, na forma

livre e complexado com a  $\gamma$ -CD, apresenta dois máximos de absorção, o primeiro situado em 400 –450 nm e o segundo em 615 – 625 nm. Neste método utiliza-se o valor médio do segundo pico (620 nm), pelo fato do valor da absorvância do BCG na forma complexada, ser maior que na forma livre. Utiliza-se o pH 3, porque se obtém nesta condição a maior porcentagem de variação da absorvância entre o meio na presença e na ausência de  $\gamma$ -CD.

### 3.2.1.1 - DOSAGEM DE $\beta$ -CICLODEXTRINA

A dosagem é realizada misturando-se 0,5 mL de amostra contendo a  $\beta$ -CD, com 2,5 mL de solução de fenolftaleína 0,06 mM, contendo tampão carbonato 0,12 M, pH 10,5 e, lendo-se a absorvância, imediatamente, a 550 nm, utilizando como zero de calibração água destilada e como branco uma solução contendo 0,5 mL de água destilada e 2,5 mL da solução de fenolftaleína 0,06 mM.

A solução de fenolftaleína 0,06 mM é preparada no momento da dosagem, misturando-se 2 mL de solução estoque de fenolftaleína 3 mM ( 0,0955 g de fenolftaleína, para um volume total de 100 mL, completado com etanol 95%), com 20 mL de tampão carbonato 0,6 M, pH = 10,5 ( 5,0880 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1,0880 g de  $\text{NaHCO}_3$ , para um volume total de 100 mL, completado com água destilada) e completando-se o volume para 100 mL com água destilada.

A concentração de  $\beta$ -CD, para amostras que não sofrem interferência pela  $\gamma$ -CD e pela dextrina, é determinada pela da equação 3.1, que é obtida a partir da equação 8.10, deduzida no anexo 8.1. A constante 6000 que aparece na equação 3.1 resulta da multiplicação do valor obtido pela diluição da amostra nas condições de dosagem (de 0,5 a 3 mL, i.e. fator de diluição igual a 6), pela transformação da concentração expressa em M para mM (i.e. 1000).

$$C_{\beta\text{-CD}} = 6000 a (1 - \text{ABS}/\text{ABS}_0) [ 1 + \text{ABS}_0 / ( K_{\beta\text{-CD}} a \text{ABS} ) ] \quad (3.1)$$

onde:

a = concentração total de fenolftaleína nas condições de dosagem. A solução de fenolftaleína 0,06 mM sofre um diluição de 1,2 vezes, sendo portanto sua concentração final igual a  $5 \times 10^{-5}$  M.

ABS = absorvância da amostra, lida a 550 nm;

ABS<sub>0</sub> = absorvância do branco, lida a 550 nm;

$C_{\beta\text{-CD}}$  = concentração de  $\beta\text{-CD}$ , expressa em mM;

$K_{\beta\text{-CD}}$  = constante de equilíbrio da formação do complexo  $\beta\text{-CD/PHE}$ .

O valor da constante de equilíbrio do complexo  $\beta\text{-CD/PHE}$  foi determinado como descrito no item 8.1.1 do anexo 2, preparando-se uma curva padrão de absorvância em função da concentração de  $\beta\text{-CD}$ , na faixa de 0 a 1 mM.

A solução estoque de  $\beta\text{-CD}$  1 mM foi preparada dissolvendo 0,1135 g de  $\beta\text{-CD}$  em 20 mL de tampão tris-HCl, pH 8, 0,05 M (6,058 g de tris-hidroximetil-aminometano, 900 mL de água destilada, adição de HCl concentrado até pH 8 e completando-se com água destilada até o volume total de 1 litro), 10 mL de solução de cloreto de cálcio 50 mM (7,351 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , para um volume total de 1 litro, completado com água destilada) e completando-se o volume para 100 mL com água destilada.

As diversas concentrações de  $\beta\text{-CD}$ , para a faixa de 0 a 1 mM, foram obtidas diluindo-se a solução estoque 1 mM, com água destilada, contendo o tampão tris-HCl, pH 8, 0,01 M e a solução de cloreto de cálcio 5 mM.

A concentração de  $\beta\text{-CD}$ , para amostras que sofrem interferência pela  $\gamma\text{-CD}$  e pela dextrina, foi determinada utilizando-se os programas apresentados no anexo 3, os quais foram elaborados com base na teoria apresentada no anexo 2. O valor da constante de equilíbrio dos complexos  $\gamma\text{-CD/PHE}$  ( $K_{\gamma\text{-CD}}$ ) e DEXTRINA/PHE ( $K_{\text{dext}}$ ), foi determinado como apresentado nos itens 3.2.1.1.1 e 3.2.1.1.2, respectivamente.

#### **3.2.1.1.1 - Interferência da $\gamma\text{-CD}$ na dosagem de $\beta\text{-CD}$**

Preparou-se uma solução estoque de  $\gamma\text{-CD}$  2 mM, dissolvendo-se 0,2594 g de  $\gamma\text{-CD}$  em 20 mL de tampão tris-HCl, pH 8, 0,05 M, 10 mL de solução de cloreto de cálcio 50 mM e completando-se o volume para 100 mL com água destilada.

A faixa de concentrações entre 0 a 2 mM foi obtida diluindo-se a solução estoque convenientemente com água destilada, contendo o tampão tris-HCl, pH 8, 0,01 M e a solução de cloreto de cálcio 5 mM. A seguir, estas soluções foram dosadas pelo método espectrofotométrico descrito no item 3.2.1.1.

O valor da constante de equilíbrio do complexo  $\gamma\text{-CD/PHE}$  foi determinado como descrito no anexo 2, a partir dos dados de absorvância em função da concentração de  $\gamma\text{-CD}$ .

### 3.2.1.1.2 - Interferência da dextrina na dosagem de $\beta$ -CD

Foram preparadas soluções de dextrina, nas concentrações de 150, 125, 100, 75, 50, 25, 10 e 5 g/L, contendo o tampão tris-HCl, pH 8, 0,01 M e a solução de cloreto de cálcio 5 mM.

Todas as amostras foram dosadas pelo método espectrofotométrico descrito no item 3.2.1.1, sendo o valor da constante de equilíbrio do complexo DEXTRINA/PHE determinado como descrito no anexo 2, a partir dos dados de absorvância em função da concentração de dextrina.

### 3.2.1.2 - DOSAGEM DE $\gamma$ CD

A dosagem de  $\gamma$ -CD é realizada misturando-se 0,5 mL da amostra, contendo a  $\gamma$ -CD, com 2,5 mL de uma solução de BCG 0,5 mM, contendo o tampão citrato 0,2 M, pH 3, e em seguida efetuando-se a leitura da absorvância em 620 nm.

A solução de BCG 0,5 mM é preparada no momento da dosagem, misturando-se 10 mL de uma solução estoque de BCG 5 mM ( 0,3600 g de BCG dissolvido em 20 mL de etanol 95%, para um volume total de 100 mL, completado com água destilada ), 10 mL de ácido cítrico 2 M ( 38,874 g de ácido cítrico anidro 99% em um volume total de 100 mL de água destilada), 5 mL de solução de hidróxido de sódio 2 M ( 8 g de hidróxido de sódio, em um volume total de solução de 100 mL) e, completando-se o volume para 100 mL com água destilada.

A curva de calibração foi construída utilizando-se amostras de concentrações conhecidas de  $\gamma$ -CD, na faixa de 0 a 2 mM, preparadas com o tampão tris-HCl pH 8, 0,01 M e a solução de cloreto de cálcio 5 mM, a partir de uma solução estoque de  $\gamma$ -CD 2 mM.

A solução estoque de  $\gamma$ -CD 2 mM foi preparada dissolvendo 0,2594 g de  $\gamma$ -CD e completando-se o volume total para 100 mL com água destilada, contendo o tampão tris-HCl, pH 8, 0,01 M e a solução de cloreto de cálcio 5 mM.

### 3.2.2 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A quantidade total de proteína presente na enzima liofilizada, bem como o teor de proteína das soluções enzimáticas empregadas na purificação, na determinação da atividade da CGTase livre e na imobilização, foram determinadas utilizando-se o método

colorimétrico de BRADFORD (1976), o qual envolve a ligação do Azul Brilhante de Coomassie G-250 com a proteína a dosar.

A coloração do corante é convertida de castanho escuro a azul, após sua ligação com a proteína; o que é um processo rápido (aproximadamente 2 min). O complexo formado (PROTEÍNA-CORANTE) permanece disperso em solução por longo tempo (aproximadamente 1 h) e a variação do máximo de absorvância pode ser detectada a 595 nm.

A dosagem é realizada misturando-se 0,3 mL da solução de proteína convenientemente diluída, com 3 mL do reagente de Bradford. A leitura da absorvância é realizada após 2 min, no comprimento de onda de 595 nm, utilizando como zero de calibração do aparelho, uma amostra com 0,3 mL de tampão tris-HCl, pH 8, 0,01 M, contendo cloreto de cálcio 5mM e 3 mL do reagente de Bradford.

O reagente de Bradford foi preparado dissolvendo-se 0,01 g de Azul Brilhante de Coomassie em 5 mL de etanol 95 %, em seguida acrescentando-se 10 mL de ácido ortofosfórico 85 % e completando-se a solução com água destilada, para um volume final de 100 mL.

A curva de calibração foi preparada a partir de amostras com concentrações conhecidas, na faixa de 0 a 0,1 mg de proteína/mL de solução, contendo o tampão tris-HCl, pH 8, 0,01 M e o cloreto de cálcio 5 mM. A solução estoque de proteína padrão, com concentração de 0,1 mg/mL, foi preparada dissolvendo-se 0,0103 g de Albumina de Soro Bovino em 20 mL de tampão tris-HCl, pH 8, 0,01 M e 10 mL de solução de cloreto de cálcio 5 mM, completando-se o volume da solução para 100 mL com água destilada.

### **3.2.2.1 - INTERFERÊNCIA DE CDs NA DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD**

Uma pequena variação na coloração do corante é verificada em amostras contendo grandes quantidades de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, induzindo ao cálculo incorreto do teor de proteína da amostra.

Esta interferência foi verificada dosando-se pelo método de Bradford, amostras contendo apenas  $\beta$ -CD, na faixa de 0 a 16 mM, e  $\gamma$ -CD, na faixa de 0 a 180 mM.

### **3.2.3 - CARACTERIZAÇÃO DA SÍLICA DE POROSIDADE CONTROLADA (SPC)**

A caracterização da sílica de porosidade controlada envolveu a determinação do diâmetro médio das partículas, da densidade cristalina, da porosidade interna da partícula e da densidade da partícula seca.

### 3.2.3.1 - DIÂMETRO MÉDIO DAS PARTÍCULAS ( $d_p$ )

O diâmetro médio das partículas de SPC foi obtido a partir da análise granulométrica, utilizando-se um conjunto de peneiras do sistema TYLER, cujas aberturas constam na tabela 3.1.

O método consiste em peneirar uma quantidade conhecida de SPC, por um período de tempo pré determinado, e pesar as frações retidas em cada peneira, limpando-se bem as suas malhas. Essas frações são devolvidas às respectivas peneiras e o processo de peneiramento e pesagem é repetido até se obter peso aproximadamente constante para cada fração. O diâmetro médio é então calculado pela equação 3.2.

$$d_p = 1 / \sum_{i=1}^n (x_i / d_{pi}) \quad (3.2)$$

onde:

$d_{pi}$  = diâmetro das partículas retidas entre duas peneiras adjacentes, em mm, que é igual à média aritmética entre os diâmetros das peneiras 1 e 2; 2 e 3; 3 e 4; etc.

$x_i$  = fração mássica das partículas retidas em cada peneira

Tabela 3.1 - Aberturas das peneiras do sistema TYLER utilizadas (PERRY & CHILTON, 1980)

MESH	ABERTURA ( mm )
20	0,833
28	0,589
32	0,495
35	0,417
42	0,351
48	0,295
60	0,246
80	0,175
100	0,147

### 3.2.3.2 - DENSIDADE CRISTALINA ( $r_s$ )

A densidade cristalina, ou densidade da matriz porosa foi determinada em balão volumétrico, devidamente aferido com água destilada à temperatura ambiente.

O método consiste em transferir para o balão uma quantidade conhecida de sílica ( $M_s$ ), deixando-a sob vácuo, a fim de se eliminar o ar contido nos espaços intra e interpartículas. Em seguida é adicionada água destilada, lentamente e ainda sob vácuo, até o completo umedecimento da sílica, e então, é completado o volume total do balão.

O volume ocupado pela sílica, ou o volume da matriz porosa ( $V_s$ ) é determinado por diferença entre o volume total do balão aferido ( $V_b$ ) e o volume total de água utilizado ( $V_a$ ).

A densidade é então calculada pela equação 3.3.

$$\rho_s = M_s / V_s \quad (3.3)$$

### 3.2.3.3 - POROSIDADE INTERNA DA PARTÍCULA ( $\epsilon_p$ )

A porosidade interna da partícula é determinada pela relação entre o volume de vazios (  $V_{zp}$  ) e o volume total das partículas (  $V_p$  ), utilizando-se a equação 3.4.

$$\epsilon_p = V_{zp} / V_p \quad (3.4)$$

O volume de vazios das partículas ( $V_{zp}$ ) foi obtido por titulação de uma quantidade conhecida de sílica até o início de seu umedecimento, conforme metodologia descrita por ZANIN (1989).

O método consiste em adicionar-se água lentamente e sob vigorosa agitação do frasco contendo a sílica, a fim de se desfazer os grumos que se formam com o umedecimento local do material. Todo o processo deve ser mantido sob vácuo, e o final da titulação é observado pela forte adesão, por capilaridade, das partículas de sílica nas paredes do recipiente. O volume de vazios das partículas corresponde ao volume de água gasto na titulação (  $V_a$  ), que é obtido a partir da massa de água utilizada (  $P_a$  ), ou seja,  $V_{zp} = V_a = P_a / \rho_a$ , onde  $\rho_a$  é a densidade da água a 25°C. O volume total das partículas ( $V_p$ ), corresponde à soma do volume de vazios ( $V_{zp}$ ) e o volume da matriz porosa ( $V_s$ ), ou seja,  $V_p = V_{zp} + V_s$ . O volume da matriz porosa é obtido a partir da massa de sílica utilizada na titulação ( $M_s$ ) e a densidade cristalina da sílica ( $\rho_s$ ), determinada como descrito no item 3.2.3.2, ou seja,  $V_s = M_s / \rho_s$ .

### 3.2.3.4 - DENSIDADE DA PARTÍCULA SECA ( $\rho_p$ )

A densidade da partícula seca, corresponde à densidade da partícula na condição dos poros estarem ocupados por ar, e é determinada pela sua relação com a porosidade interna da partícula ( $\epsilon_p$ ) e a densidade da matriz porosa ( $\rho_s$ ), como mostra a equação 3.5.

$$\rho_p = (1 - \epsilon_p) \rho_s \quad (3.5)$$

### 3.2.4 - EXPANSÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS

A expansão do leito de partículas teve por finalidade a obtenção da relação entre a porosidade do leito fluidizado ( $\epsilon$ ) e a velocidade superficial do fluido ( $u$ ), bem como a obtenção da velocidade terminal das partículas ( $u_t$ ), o coeficiente de expansão ( $n$ ) e a velocidade mínima de fluidização ( $u_{mf}$ ), pelo ajuste dos dados obtidos com a correlação de RICHARDSON & ZAKI (1954).

A expansão foi conduzida no reator apresentado na figura 3.2, utilizando-se como fluido água destilada à temperatura ambiente. A água foi escolhida pois sua viscosidade e sua densidade à temperatura ambiente são semelhantes a da solução de dextrina 100 g/L a 50°C, solução esta utilizada como substrato para a produção de CDs no reator de leito fluidizado, com a CGTase imobilizada em SPC. Com a utilização da água, além de se ter uma economia de substrato, pode-se conduzir a expansão mais facilmente, pois dispensa-se o controle da temperatura.

Inicialmente adicionou-se ao reator 25 g de SPC, previamente umedecida sob vácuo. Após a completa compactação das partículas, expandiu-se o leito, de forma rápida, até a altura máxima permissível sem que se observasse o arraste de partículas (aproximadamente 93 cm). A partir deste ponto, tinha início o processo da diminuição gradativa da vazão, até que o leito de partículas retornasse à condição de leito fixo. Operava-se por 20 minutos em cada vazão para garantir a completa estabilização do leito e media-se então a vazão do fluido e a altura do leito, em triplicata.

A porosidade do leito ( $\epsilon$ ) foi calculada a partir da equação 2.1, usando-se a massa de 25 g de sílica no reator ( $M_s = 25$  g). A área da seção reta do reator ( $A_R$ ) é de 2,0032 cm<sup>2</sup>.

Os dados experimentais de porosidade do leito em função da velocidade superficial do fluido foram ajustados à correlação de RICHARDSON & ZAKI (1954), obtida para a expansão de leitos com partículas esféricas de diâmetro uniforme

(equações 2.2 e 2.3). A partir destas equações determinou-se a velocidade terminal da partícula e o coeficiente de expansão.

A velocidade de mínima fluidização ( $u_{mf}$ ) foi obtida a partir dos dados experimentais de porosidade do leito em função da velocidade superficial do fluido, correspondendo à interseção dos ajustes da correlação de RICHARDSON & ZAKI para as regiões de leito fixo e leito fluidizado.

### **3.2.5 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA DA ENZIMA LIOFILIZADA ( CGTase WACKER )**

Preparou-se uma solução estoque de 1 g/L de CGTase, dissolvendo-se 0,1 g da enzima liofilizada em 20 mL de tampão tris-HCl, pH 8, 0,05 M e 10 mL de solução de cloreto de cálcio 50 mM, completando-se o volume para 100 mL com água destilada.

Quatro soluções de trabalho foram preparadas a partir de diluições 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5 da solução estoque, com tampão tris-HCl pH 8, 0,01 M, contendo cloreto de cálcio 5 mM.

As soluções de trabalho foram submetidas à dosagem de proteínas pelo método colorimétrico de BRADFORD, descrito no item 3.2.2.

### **3.2.6 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

De acordo com ZANIN (1989), Dixon e Webb (1979) relataram que a velocidade da maioria das reações enzimáticas diminui com o tempo, devido a fatores como: (i) inibição da enzima pelos produtos; (ii) diminuição do grau de saturação da enzima com o substrato, devido ao decréscimo da concentração do substrato à medida que a reação avança; (iii) reações reversas podem se tornar mais importantes, devido ao aumento da concentração de produtos; e, (iv) inativação da enzima pela temperatura ou pelo pH. Esses fatores, agindo isoladamente ou em conjunto, contribuem para que a curva de reação enzimática não siga exatamente as equações das reações químicas homogêneas.

Como os fatores acima mencionados não se manifestam no início da reação, a atividade enzimática da CGTase livre e imobilizada foi determinada pela medida da velocidade inicial da reação, que é obtida a partir da primeira parte da curva de progresso da reação, que é linear até aproximadamente 20 % de conversão de substrato em produtos (ZANIN, 1989).

### 3.2.6.1 - ATIVIDADE DA CGTase LIVRE

A atividade da CGTase livre foi determinada pela medida da velocidade inicial da reação de produção de CDs utilizando-se o método estático em tubos de ensaio, sendo o substrato uma solução de dextrina 10 g/L, contendo tampão tris-HCl pH 8, 0,01 M e cloreto de cálcio 5 mM. A concentração da solução enzimática empregada nos testes de atividade da CGTase WACKER foi da ordem de  $2,46 \times 10^{-4}$  mg proteína/mL de solução, que garantia uma relação linear entre a quantidade de  $\beta$ -CD produzida e o tempo de reação, como é necessário no método das velocidades iniciais.

Inicialmente preparou-se o ponto zero do teste aquecendo-se 1,5 mL de solução enzimática diluída a 100°C por 5 min, para a inativação da enzima. Em seguida adicionou-se 1,5 mL do substrato, totalizando um volume reacional de 3,0 mL, e aquecendo-se novamente a 100°C por mais 5 min, seguido de resfriamento.

Os tubos para os diferentes tempos de reação ( 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos ), contendo 1,5 mL de substrato, eram imersos num banho a 50°C e após a estabilização da temperatura adicionava-se 1,5 mL da solução enzimática diluída, atingindo-se uma concentração final de dextrina de 5 g/L. Atingido cada tempo de reação os tubos eram aquecidos a 100°C por 5 min para a inativação da enzima e em seguida resfriados em água à temperatura ambiente.

Para todos os tempos de reação determinou-se a concentração de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, pelos métodos colorimétricos da fenolftaleína e do verde de bromocresol, descritos nos itens 3.2.1.1 e 3.2.1.2, respectivamente.

Os dados de produção de ciclodextrina ( $\mu$ moles CD/(min x mL)) foram plotados em função do tempo de reação e o coeficiente angular da reta ajustada (b) foi utilizado para calcular a atividade e a atividade específica pelas equações 3.6 e 3.7, respectivamente.

$$A = ( b \times V_R \times D ) / V_{SE} \quad (3.6)$$

$$A_e = A / C_P \quad (3.7)$$

onde:

A = atividade enzimática em  $\mu$ moles CD / (min x mL de solução enzimática)

A<sub>e</sub> = atividade específica em  $\mu$ moles CD / ( min x mg de proteína )

b = coeficiente angular da reta ajustada em  $\mu$ moles CD / ( min x mL )

$C_P$  = concentração de proteína da solução enzimática em mg de proteína / mL

$D$  = diluição da solução enzimática

$V_R$  = volume reacional em mL

$V_{SE}$  = volume em mL da solução enzimática diluída para as condições do teste

### 3.2.6.2 - ATIVIDADE DA CGTase IMOBILIZADA

A atividade da CGTase imobilizada foi determinada pela medida da velocidade inicial da reação, obtida a partir da curva de CDs produzidas em função do tempo. A reação foi conduzida no reator batelada com agitação magnética, mostrado na figura 3.1.

Os testes foram conduzidos a 50°C, utilizando-se como substrato 100 mL de soluções de dextrina 5 g/L ( pH 7 e 8 ) e 100 g/L ( pH 7 e 8 ), preparadas com tampão tris-HCl 0,01 M ( pH 7 e 8 ) e solução de cloreto de cálcio 5 mM. A atividade da CGTase imobilizada foi determinada no pH 7, pois de acordo com HAMON & MORAES (1990), esta enzima, em solução, possui um máximo de atividade neste pH, e no pH 8, com o objetivo de se comparar com os resultados disponíveis dos estudos de HAMOM & MORAES (1990) e MORAES et al. (1990), que verificaram que a CGTase imobilizada possui uma atividade maior neste pH. Com relação às concentrações de dextrina, determinou-se a atividade da CGTase imobilizada utilizando-se solução de dextrina 5 g/L, para se comparar com a atividade da CGTase livre, determinada a 50°C, pH 8 e utilizando-se dextrina 5 g/L. Nesta concentração de dextrina, segundo estudos de HAMON & MORAES (1990), a CGTase possui uma maior atividade enzimática. A concentração de 100 g/L foi escolhida, por ser uma concentração de substrato situada na faixa de interesse industrial, sendo portanto a concentração utilizada na produção de CDs no reator de leito fluidizado, e ainda, por se poder comparar os resultados obtidos com aqueles de HAMON & MORAES (1990) para a CGTase livre.

Inicialmente lavou-se a enzima imobilizada com água destilada e secou-se a vácuo por sucção, pesando-se em seguida 0,5 g, base úmida, para o teste e 0,5 g, base úmida, para a determinação da umidade em estufa a 105°C por 15 horas. Um volume de 100 mL de substrato foi adicionado no reator batelada tipo cesta, na ausência da enzima imobilizada, e após a estabilização da temperatura do substrato no reator, retirou-se uma alíquota de 1 mL que foi adicionada num tubo de ensaio já contendo 1 mL de água. Esta amostra foi aquecida a 100°C por 5 min, constituindo o ponto zero do teste. Posteriormente, introduziu-se a cesta contendo a enzima imobilizada e acionou-se imediatamente o cronômetro. Durante um período de 30 minutos, retirou-se alíquotas em intervalos fixos de tempo ( 2 min e/ou 5 min), sendo em seguida retirado o cesto e

coletado mais três alíquotas, totalizando-se 45 minutos de ensaio. Todas as alíquotas coletadas eram de 1 mL e foram introduzidas em um tubo de ensaio já contendo 1 mL de água, e aquecidas a 100°C por 5 minutos para a inativação da enzima que eventualmente se desprendesse do suporte.

Para todas as amostras coletadas foram determinadas as concentrações de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, pelos métodos colorimétricos da fenolftaleína e do verde de bromocresol, descritos nos itens 3.2.1.1 e 3.2.1.2, respectivamente. As concentrações reais de CD foram multiplicadas pelo volume reacional restante em cada tempo de reação e plotou-se mmoles de CD produzidos em função do tempo de reação. O coeficiente angular ( $b'$ ) da reta ajustada a estes dados foi utilizado para o cálculo da atividade e da atividade específica pelas das equações 3.8 e 3.9.

$$A_{EI} = (b' \times 1000) / M_{EI} \quad (3.8)$$

$$A_{eEI} = A_{EI} / P_{EI} \quad (3.9)$$

onde:

$A_{eEI}$  = atividade específica da EI, expressa em  $\mu$ moles CD / ( min x mg proteína )

$A_{EI}$  = atividade da EI em  $\mu$ moles CD / ( min x g<sub>EI</sub> )

$b'$  = coeficiente angular da reta ajustada em mmoles CD / min

EI = enzima imobilizada

$M_{EI}$  = massa de enzima imobilizada, base seca, ( g )

$P_{EI}$  = teor de proteína da EI ( mg de proteína / g<sub>EI</sub> )

### 3.2.7 - PURIFICAÇÃO DA CGTase WACKER

A enzima Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase), citada no item 3.1.2, foi purificada por Cromatografia de Afinidade Bioespecífica (CAB), segundo uma adaptação, descrita a seguir, da metodologia utilizada por BERNA et al. (1996).

#### 3.2.7.1 - PREPARAÇÃO DO SUPORTE CROMATOGRÁFICO ( $\beta$ -CD-SEPHAROSE 6B)

A preparação do suporte cromatográfico envolve duas etapas: a ativação da Sepharose 6B (gel de agarose) utilizando-se dioxirano (1,4 butanodiol diglicidil éter) e a imobilização do ligante  $\beta$ -CD no suporte ativado.

### 3.2.7.1.1 - Ativação do Gel de Agarose

Inicialmente a Sepharose 6B foi lavada abundantemente com água destilada para se eliminar o etanol, que é o antibacteriano do gel. Em seguida, preparou-se um mistura onde, para cada 1 g de sepharose 6B seca por sucção, foram adicionados 1 mL de dioxirano e 1 mL de NaOH 0,6 M, contendo 2 mg de NaBH<sub>4</sub>. Esta mistura foi mantida sob agitação mecânica por 8 horas a 25°C. Nesta etapa ocorreu a reação de um grupamento epoxi do dioxirano com um grupamento hidroxila da matriz de agarose.

### 3.2.7.1.2 - Imobilização do ligante $\beta$ -CD

O gel ativado foi lavado abundantemente com água destilada para se eliminar o excesso de dioxirano, e estabilizado por 5 minutos em uma solução de NaOH 0,1 M. Para cada 1 g do gel ativado e seco por sucção, adicionou-se 2 mL de NaOH 0,1 M, contendo 20% (p/v) do ligante  $\beta$ -CD e agitou-se mecanicamente esta mistura por 16 horas a 45°C. Nesta etapa ocorreu a ligação do segundo grupamento epoxi do dioxirano com um grupamento hidroxila do ligante.

Completada a imobilização do ligante, o suporte cromatográfico foi lavado com água destilada e tampão tris-HCl 50 mM, pH 8, a fim de se eliminar as moléculas de  $\beta$ -CD não fixadas. O suporte cromatográfico foi então estocado a 4°C no mesmo tampão, contendo 0,1% (p/v) do conservante benzoato de sódio.

A figura 3.3 mostra as principais etapas envolvidas na preparação do suporte cromatográfico (LÁSZLÓ et al., 1981; BERNA et al., 1996).

### 3.2.7.2 - PROCESSO CROMATOGRÁFICO

As cromatografias foram realizadas em uma coluna de vidro encamisada de 1 x 30 cm, contendo aproximadamente 20 mL de suporte cromatográfico (17 g) e mantida a 4°C com a ajuda de um banho termostático. A vazão de trabalho foi de 0,4 mL/min em fluxo descendente, mantida por uma bomba peristáltica acoplada na base inferior da coluna. Na primeira cromatografia utilizou-se um coletor de frações ADVANTEC. A figura 3.4 mostra o sistema completo utilizado na CAB.

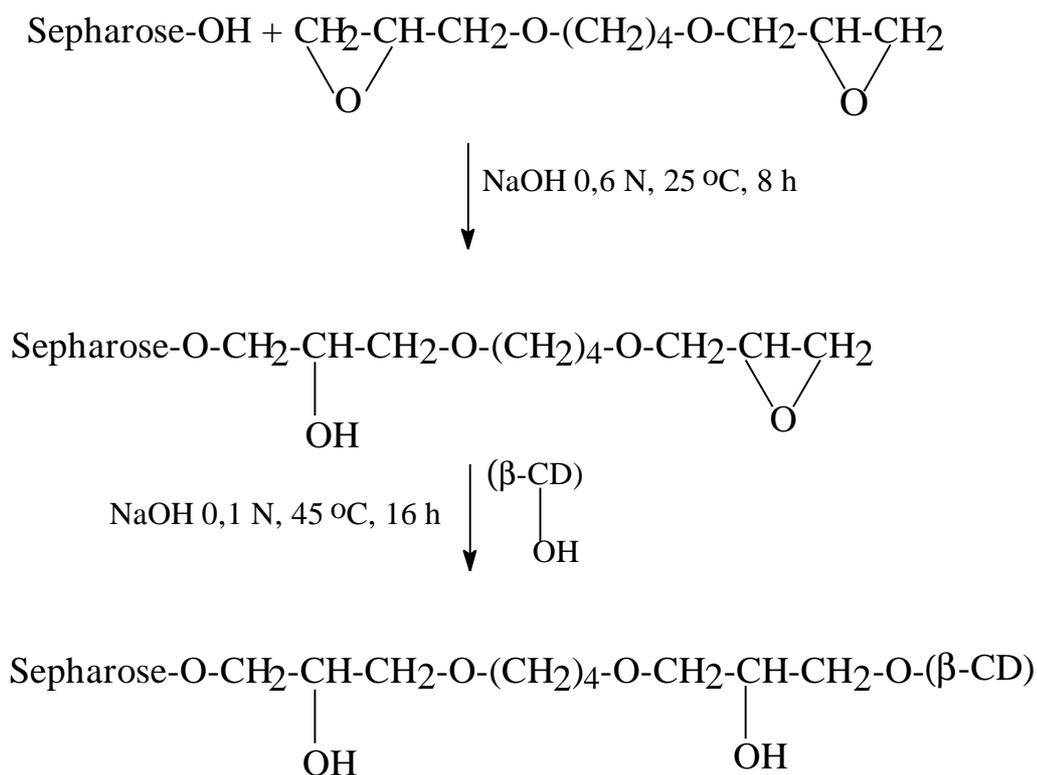


Figura 3.3 - Esquema da preparação do suporte para a cromatografia de afinidade bioespecífica (CAB)

Inicialmente o suporte cromatográfico foi estabilizado usando-se tampão de cromatografia (tampão tris-HCl 30 mM, pH 8, contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM) num volume total de aproximadamente 10 vezes o volume do suporte. Em seguida foi preparada uma solução enzimática dissolvendo-se 3,48 g de enzima liofilizada em 50 mL de tampão de cromatografia. Esta solução foi aplicada na extremidade superior da coluna, reservando-se uma alíquota para a determinação do total de proteína presente. Após a aplicação de toda solução enzimática, as impurezas foram eluídas utilizando-se o tampão de cromatografia, sendo esta etapa conduzida até a constatação de uma baixa concentração de proteína no eluente. A CGTase pura foi então eluída utilizando-se o tampão de cromatografia, contendo 10 mg/mL de β-CD. Nesta etapa, o eluente era coletado em alíquotas de 2,5 mL e determinava-se a quantidade de proteína presente em cada alíquota. Após a coleta de 70 alíquotas, foi recolhido um volume adicional de 84 mL para garantir a eluição de toda CGTase.

Após a cromatografia, o suporte cromatográfico foi regenerado através da percolação de uma solução de NaOH 10 mM, seguido de uma nova estabilização com tampão de cromatografia e conservado a 4°C.

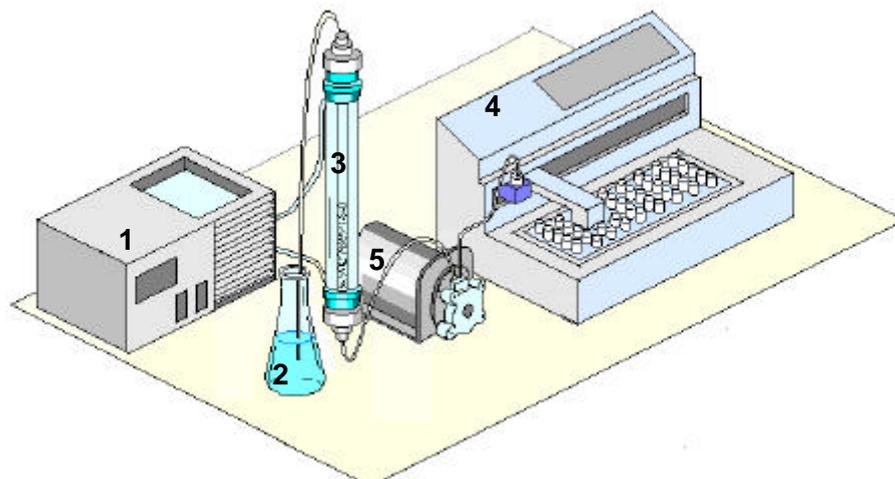


Figura 3.4 - Sistema utilizado na purificação da CGTase WACKER por cromatografia de afinidade biospecífica; componentes: (1) banho termostático, (2) tampão cromatográfico para eluição das impurezas e da CGTase, (3) coluna cromatográfica contendo o gel  $\beta$ -CD-Sepharose 6B, (4) coletor de amostras e (5) bomba peristáltica.

Todas as dosagens de proteína foram feitas pelo método de BRADFORD (1976), conforme metodologia descrita no item 3.2.2. A pesquisa da CGTase nas alíquotas que apresentaram proteína foi realizada pela determinação da atividade quanto à produção de  $\beta$ -CD, incubando-se uma amostra contendo 1,0 mL de solução de dextrina 10 g/L, pH 8 e 1,0 mL de cada alíquota convenientemente diluída, por 20 minutos a 50°C, seguido da interrupção da reação pelo aquecimento da mistura a 100°C por 5 min. Para cada alíquota foi preparado um ponto zero do teste de atividade, levando-se 0,5 mL de cada alíquota diluída a 100°C por 5 min e adicionando-se posteriormente 0,5 mL de solução de dextrina 10 g/L, seguido novamente de aquecimento a 100°C por 5 min. Após resfriamento à temperatura ambiente as amostras eram conservadas a 4°C até o momento da dosagem. As concentrações de  $\beta$ -CD foram determinadas pela dosagem colorimétrica da fenolftaleína, conforme metodologia apresentada no item 3.2.1.1, e a atividade de ciclização determinada pela equação 3.6, calculando-se o valor de b pela equação 3.10.

$$b = (C_{\beta\text{-CD}}|_{t=20} - C_{\beta\text{-CD}}|_{t=0}) / 20 \quad (3.10)$$

As frações contendo a CGTase purificada foram reunidas em um único volume e a sua atividade determinada de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.6.1.

### 3.2.8 - IMOBILIZAÇÃO DA CGTase PURIFICADA

A enzima CGTase purificada, conforme metodologia descrita no item 3.2.7, foi imobilizada em sílica de porosidade controlada pelo método da ligação covalente, desenvolvido por Weetall et al. (1976) e descrito por ZANIN (1989). As etapas envolvidas na imobilização foram: hidratação do suporte; silanização do suporte; ativação do suporte com o reagente bifuncional glutaraldeído; e, imobilização da enzima.

#### 3.2.8.1 - HIDRATAÇÃO DO SUPORTE

Mil mL de uma solução de ácido nítrico diluído 1:20 foram adicionados a 100 g de sílica de porosidade controlada (SPC), com diâmetro médio de partículas igual a 0,42 mm. Esta mistura foi mantida sob agitação em um banho maria a 82°C, por 1 hora. Posteriormente, a mistura foi lavada com água destilada em funil de Büchner até pH neutro do filtrado, e o vácuo prolongado por mais 5 minutos.

#### 3.2.8.2 - SILANIZAÇÃO DO SUPORTE

O método de ligação covalente de enzimas em suportes inorgânicos envolve a utilização de derivados do silano contendo um grupo orgânico funcional. Nesta etapa ocorre a condensação do resíduo etoxi do silano com o grupo hidroxila da superfície do suporte, produzindo um derivado alquilamino, como mostra a figura 3.5.

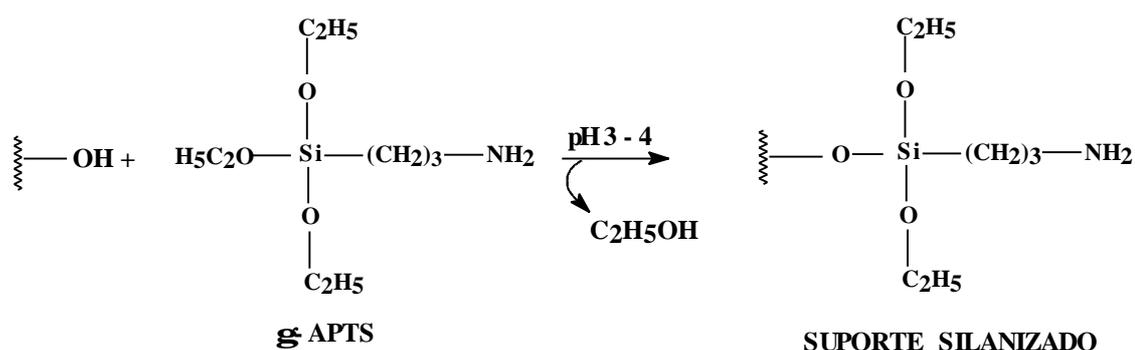


Figura 3.5 - Reação envolvida na etapa de silanização do suporte

Preparou-se uma solução de  $\gamma$ -aminopropil-trietoxissilano ( $\gamma$ -APTS) 0,5% (v/v), diluindo-se 2,5 mL de  $\gamma$ -APTS (FLUKA) para um volume final de 500 mL, completado com água destilada. O pH desta solução foi ajustado para um valor entre 3 e 4 com uma solução de HCl 0,6 N. Foram gastos 20,3 mL para se obter um pH de 3,59.

Duzentos mL da solução  $\gamma$ -APTS 0,5 % v/v, pH 3,59 foram adicionados à SPC hidratada. Esta mistura foi agitada por 5 minutos à temperatura ambiente e por 3 horas a 75°C, em um banho maria. O suporte silanizado foi lavado a vácuo com água destilada para se eliminar o excesso de  $\gamma$ -APTS e seco em estufa a 105°C por 15 horas, obtendo-se 97,378 g do suporte silanizado seco.

### 3.2.8.3 - ATIVAÇÃO DO SUPORTE

A ativação do suporte envolve a modificação do grupo orgânico funcional do suporte silanizado, produzindo um intermediário reativo. A ativação com o glutaraldeído envolve a reação de formação da base de Schiff, que origina um aldeído ativo, como mostra a figura 3.6.

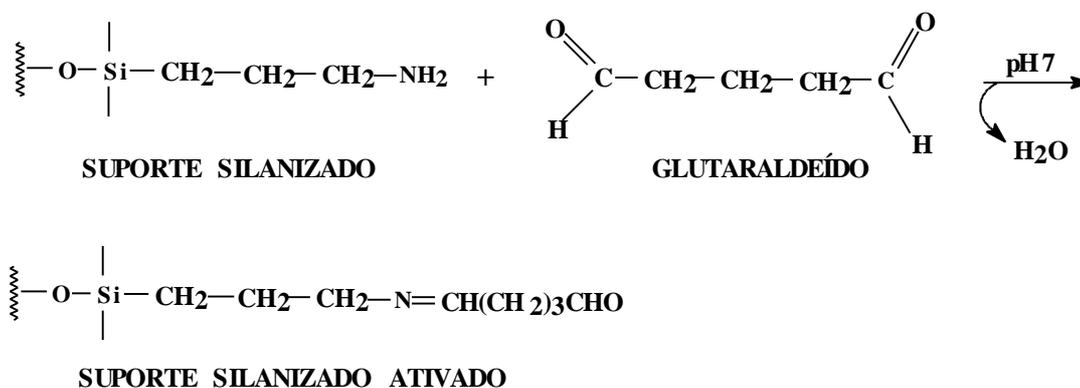


Figura 3.6 - Reação envolvida na ativação do suporte silanizado

Preparou-se uma solução de glutaraldeído a 2,5% v/v, diluindo-se em 1:10 a solução aquosa de glutaraldeído 25% (RIEDEL-DE-HAEN) com tampão hidrogenofosfato de sódio 0,1 M, pH 7. Este tampão foi preparado misturando-se 65 mL de uma solução de ácido cítrico 0,1 M e 436 mL de uma solução de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M, completando-se o volume para 1000 mL com água destilada.

O suporte silanizado foi submetido ao vácuo por 20 minutos e em seguida adicionado lentamente e ainda sob vácuo à solução de glutaraldeído a 2,5% v/v, até a completa imersão do sólido, sendo gasto 2 mL de solução/g suporte silanizado. Esta mistura foi agitada em banho maria a 26°C por 1 hora e em seguida lavada com água destilada a fim de se eliminar o excesso de glutaraldeído.

### 3.2.8.4 - IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA CGT ase PURIFICADA

A imobilização da enzima envolve provavelmente a reação entre o grupo aldeído do suporte ativado e o grupo amino da enzima, como esquematizado na figura 3.7.

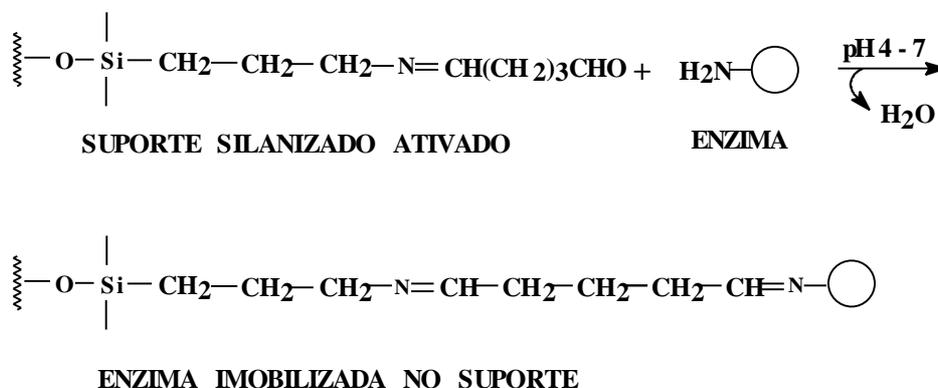


Figura 3.7 - Reação envolvida na etapa de imobilização da enzima

Inicialmente, o suporte ativado e seco por sucção ( $M_{S1}$ ) foi posto em contato com a solução enzimática de CGTase purificada, obtida conforme metodologia apresentada no item 3.2.7.2. Esta mistura foi agitada em banho maria a 26°C, por 24 horas. A umidade do suporte ativado foi determinada em estufa a 105°C por 15 horas.

Após completada a reação de imobilização, o material foi filtrado a vácuo, medindo-se o volume do filtrado ( $V_1$ ) e determinando-se a umidade da enzima imobilizada seca por sucção ( $M_{S2}$ ), em estufa a 105°C por 15 horas.

A enzima imobilizada seca por sucção foi então lavada a vácuo várias vezes com água destilada e com tampão tris-HCl, pH 7, 50 mM, medindo-se os volumes dos filtrados ( $V_2$  e  $V'_2$ , respectivamente). Pesou-se a enzima imobilizada e determinou-se sua umidade em estufa a 105°C por 15 horas. Esta enzima foi lavada novamente com tampão tris-HCl, pH 7, 50 mM, contendo 0,1% de benzoato de sódio ( $V_3$ ) e estocada a 4°C

Determinou-se o teor de proteína de todos os filtrados ( $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V'_2$  e  $V_3$ ), pelo método colorimétrico de Bradford, conforme metodologia descrita no item 3.2.2, com o objetivo de se determinar o total de CGTase não fixada no suporte, permitindo-se assim o cálculo do rendimento de fixação obtido na imobilização.

Determinou-se a atividade da CGTase imobilizada seguindo a metodologia descrita no item 3.2.6.2. As atividades dos filtrados ( $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V'_2$  e  $V_3$ ) foram também determinadas (conforme metodologia descrita no item 3.2.6.1) com o objetivo de se calcular o rendimento em atividade obtido na imobilização.

### 3.2.9 - PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS EM REATOR DE LEITO FLUIDIZADO COM A ENZIMA CGTase IMOBILIZADA

O estudo da conversão de dextrina em ciclodextrinas ( $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD) em função do tempo de residência do substrato no leito de partículas foi realizado no reator de leito fluidizado, esquematizado na figura 3.2, variando-se a carga enzimática no reator e mantendo-se fixa a velocidade superficial da solução de substrato num valor que fornecia uma porosidade nominal de leito de aproximadamente 0,5.

A velocidade superficial do substrato ( $u$ ) foi mantida em aproximadamente 3,74 cm/min, que correspondia a uma vazão de 7,5 mL/min, sendo o valor de  $u$  determinado pela equação 2.2, ajustada aos dados experimentais de expansão do leito como descrito no item 3.2.4.

O substrato utilizado foi uma solução de dextrina 100 g/L, pH 8, contendo tampão tris-HCl 10 mM e solução de cloreto de cálcio 5 mM; como biocatalisador utilizou-se a enzima CGTase imobilizada em SPC, conforme metodologia descrita no item 3.2.8; e, a temperatura de reação foi de 50°C.

Inicialmente a enzima imobilizada (EI) foi lavada com água destilada e seca por sucção e sua umidade determinada em estufa a 105°C por 15 horas. A massa total de EI seca por sucção, foi dividida em 27 lotes com aproximadamente 5 g (peso úmido) e 1 lote com 21,6712 g (peso úmido). Cada lote de EI foi deixado sob vácuo por aproximadamente 10 minutos e, ainda sob vácuo, foi adicionado o substrato até a completa imersão das partículas.

Ajustou-se a temperatura do reator para 50°C e a vazão do substrato para 7,5 mL/min. Os lotes de EI foram adicionados ao reator até que o leito de partículas expandido ocupasse todo o seu volume útil. Para cada lote de enzima imobilizada foi executado o seguinte procedimento:

- a) desligava-se a bomba peristáltica e adicionava-se ao reator um dos lotes de 5 g de EI. Após a compactação do leito, media-se a altura do leito fixo ( $H_0$ ).
- b) ligava-se a bomba, dando início à fluidização. Aguardava-se 30 minutos para a estabilização do leito e media-se a vazão e a altura do leito expandido.
- c) Coletava-se, na saída do reator, amostras de aproximadamente 10 mL a cada 10 minutos, até integralizar o tempo total de ensaio (1 hora) para cada massa de EI. As amostras eram levadas a um banho sob fervura por 5 minutos, para desativação da enzima que eventualmente pudesse ter sido desprendida do

suporte ou arrastada pelo substrato. A cada 10 minutos verificava-se também a vazão e a altura do leito expandido.

- d) Interrompia-se a vazão de substrato e após a compactação do leito de partículas media-se novamente a altura do leito fixo.

A porosidade do leito expandido para cada massa de enzima imobilizada no reator era calculada pela equação 2.1.

Determinou-se a concentração de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD de todas as amostras coletadas, pelos métodos de dosagem colorimétrico da fenoltaleína e do verde de bromocresol, respectivamente, conforme metodologia descrita nos itens 3.2.1.1 e 3.2.1.2.

A conversão da dextrina a uma determinada ciclodextrina,  $\beta$ -CD ou  $\gamma$ -CD, foi calculada pelas equações 3.11 e 3.12.

$$X_{A\beta} = 1,135 C_{\beta\text{-CD}} / C_{A i} \quad (3.11)$$

$$X_{A\gamma} = 1,29714 C_{\gamma\text{-CD}} / C_{A i} \quad (3.12)$$

onde:

$C_{A i}$  = Concentração inicial de dextrina em g/L

$C_{\beta\text{-CD}}$  = Concentração de  $\beta$ -CD em mM

$C_{\gamma\text{-CD}}$  = Concentração de  $\gamma$ -CD em mM

A conversão total de dextrina em ciclodextrinas ( $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD) é obtida pela soma das conversões em  $\beta$ -CD e em  $\gamma$ -CD, ou seja:

$$X_A = X_{A\beta} + X_{A\gamma} \quad (3.13)$$

onde:

$X_A$  = Conversão total de dextrina em ciclodextrinas

$X_{A\beta}$  = Conversão de dextrina em  $\beta$ -CD

$X_{A\gamma}$  = Conversão de dextrina em  $\gamma$ -CD

As constantes numéricas das equações 3.11 e 3.12 (1,135 e 1,29714, respectivamente) resultaram da transformação das concentrações de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, respectivamente, expressas em mM, para concentrações expressas em g/L.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nos diversos ensaios executados, conforme metodologia descrita no capítulo 3.

### 4.1 - CURVAS PADRÕES DE DOSAGEM DE CICLODEXTRINAS E PROTEÍNAS

Neste item será apresentado um exemplo das curvas de calibração utilizadas nas determinações espectrofotométricas da  $\beta$ -CD, da  $\gamma$ -CD e de proteínas. A metodologia utilizada está descrita nos itens 3.2.1.1, 3.2.1.2 e 3.2.2, respectivamente.

#### 4.1.1 - CURVA PADRÃO PARA A DOSAGEM DE $\beta$ -CICLODEXTRINA

Na tabela 4.1 apresenta-se os resultados da dosagem dos padrões de  $\beta$ -CD, para as concentrações de 0 a 1 mM, pelo método colorimétrico da fenolftaleína (PHE), conforme metodologia descrita no item 3.2.1.1.

Tabela 4.1 - Absorvância em função da concentração de  $\beta$ -CD, obtida pelo método de dosagem colorimétrico da fenolftaleína (PHE)

$C_{\beta\text{-CD}}$ (mM)	$C_{\beta\text{-CD}}$ corrigida (mM)	Absorvância a 550 nm
0,00	0,0000	1,450
0,10	0,0836	1,296
0,20	0,1672	1,129
0,30	0,2508	1,014
0,40	0,3344	0,904
0,50	0,4180	0,788
0,60	0,5016	0,716
0,70	0,5852	0,639
0,80	0,6688	0,585
0,90	0,7524	0,538
1,00	0,8360	0,493

Os valores da concentração corrigida de  $\beta$ -CD,  $C_{\beta\text{-CD}} \text{ corrigida}$ , foram calculadas considerando a umidade da  $\beta$ -CD padrão, determinada pelo método Karl Fisher, que forneceu o valor de 16,4%.

Os dados de absorvância em função da concentração de  $\beta$ -CD foram ajustados utilizando a equação 8.10 do anexo 1, onde o valor da constante de equilíbrio do complexo  $\beta$ -ciclodextrina-fenolftaleína ( $K_{\beta\text{-CD}}$ ) foi estimado conforme descrito no item 8.1.1 do anexo 1, que conduziu ao valor de  $18014,82 \text{ M}^{-1}$ . A substituição das constantes “a” e “ $K_{\beta\text{-CD}}$ ” na equação 3.1 resulta na equação 4.1, utilizada para a determinação das concentrações de  $\beta$ -CD para amostras que não sofrem interferência pela presença de  $\gamma$ -CD e elevadas concentrações de dextrina.

$$C_{\beta\text{-CD}} = 0,3 (1 - \text{ABS}/\text{ABS}_0) (1 + 1,1102 \text{ABS}_0 / \text{ABS}) \quad (r = 0,9992) \quad (4.1)$$

onde:

ABS = absorvância da solução de dosagem na presença de CD, lida a 550 nm;

$\text{ABS}_0$  = absorvância da solução de dosagem na ausência de CD, lida a 550 nm;

$C_{\beta\text{-CD}}$  = concentração de  $\beta$ -CD, expressa em mM;

A figura 4.1 mostra os dados experimentais de absorvância em função da concentração de  $\beta$ -CD, ajustados com a equação 4.1.

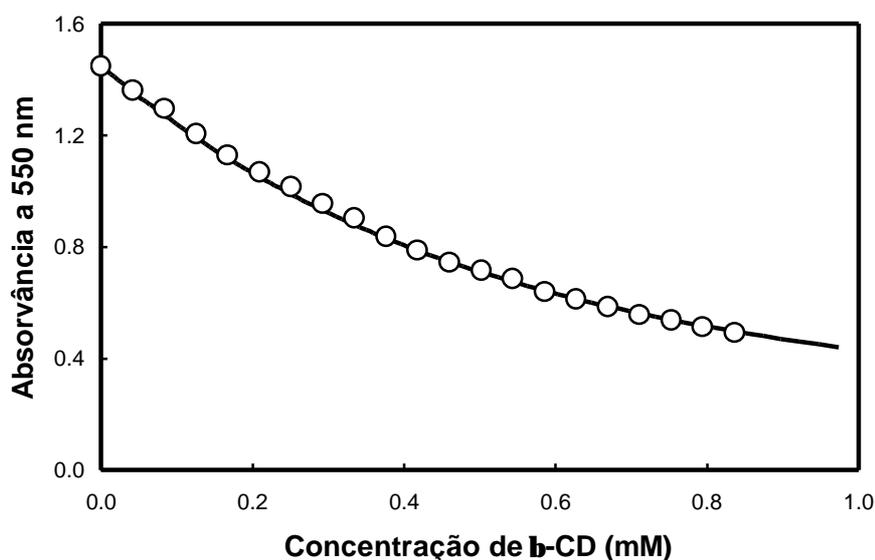


Figura 4.1 - Ajuste dos dados experimentais de absorvância em função da concentração de  $\beta$ -CD, obtidos pelo método de dosagem com a PHE.

A determinação da concentração de  $\beta$ -CD para amostras contendo  $\gamma$ -CD e elevada concentração de dextrina é realizada por meio dos programas 1 e 2, listados no anexo 3, os quais foram elaborados com base na teoria descrita no anexo 2. As constantes de equilíbrio para a  $\gamma$ -CD ( $K_{\gamma\text{-CD}}$ ) e para a dextrina ( $K_{\text{dext}}$ ) foram determinadas como descrito nos itens 3.2.1.1.1 e 3.2.1.1.2, cujos resultados encontram-se nos itens 4.1.1.1 e 4.1.1.2, a seguir.

#### 4.1.1.1 - INTERFERÊNCIA DA $\gamma$ -CD NA DOSAGEM DE $\beta$ -CD

Neste item são apresentados os resultados da dosagem de soluções padrões de  $\gamma$ -CD, para concentrações de 0 a 2 mM, utilizando o método de dosagem colorimétrico da fenolftaleína, conforme metodologia descrita no item 3.2.1.1.

Na tabela 4.2 apresenta-se as absorvâncias obtidas para as amostras padrões de  $\gamma$ -CD. As concentrações corrigidas de  $\gamma$ -CD,  $C_{\gamma\text{-CD corrigida}}$ , foram calculadas considerando-se a umidade da  $\gamma$ -CD padrão, determinada pelo método Karl Fisher, que forneceu valor de 10,49%.

Tabela 4.2 - Absorvâncias obtidas na dosagem de  $\gamma$ -CD pelo método da PHE

$C_{\gamma\text{-CD}}$ (mM)	$C_{\gamma\text{-CD corrigida}}$ (mM)	Absorvância a 550 nm
0,0	0,0000	1,450
0,2	0,1790	1,378
0,4	0,3580	1,305
0,6	0,5371	1,245
0,8	0,7161	1,173
1,0	0,8951	1,131
1,2	1,0741	1,073
1,4	1,2531	1,037
1,6	1,4322	0,980
1,8	1,6112	0,938
2,0	1,7902	0,919

Os dados de absorvância em função da concentração de  $\gamma$ -CD foram ajustados utilizando-se a equação 8.10 do anexo 1 como modelo estimativo. O valor da constante de equilíbrio para o complexo  $\gamma$ -ciclodextrina-fenolftaleína ( $K_{\gamma\text{-CD}}$ ), determinado como descrito no anexo 2, foi de  $2106,53 \text{ M}^{-1}$ . A substituição desta constante na equação 3.1, juntamente com o valor da concentração de fenolftaleína nas condições de dosagem, conduz à equação 4.2, de ajuste dos dados experimentais da tabela 4.2, mostrado graficamente na figura 4.2.

$$C_{\gamma\text{-CD}} = 0,3 (1 - \text{ABS}/\text{ABS}_0) (1 + 9,4943 \text{ABS}_0/\text{ABS}) \quad (r = 0,9989) \quad (4.2)$$

onde:

$C_{\gamma\text{-CD}}$  = concentração de  $\gamma$ -CD em mM

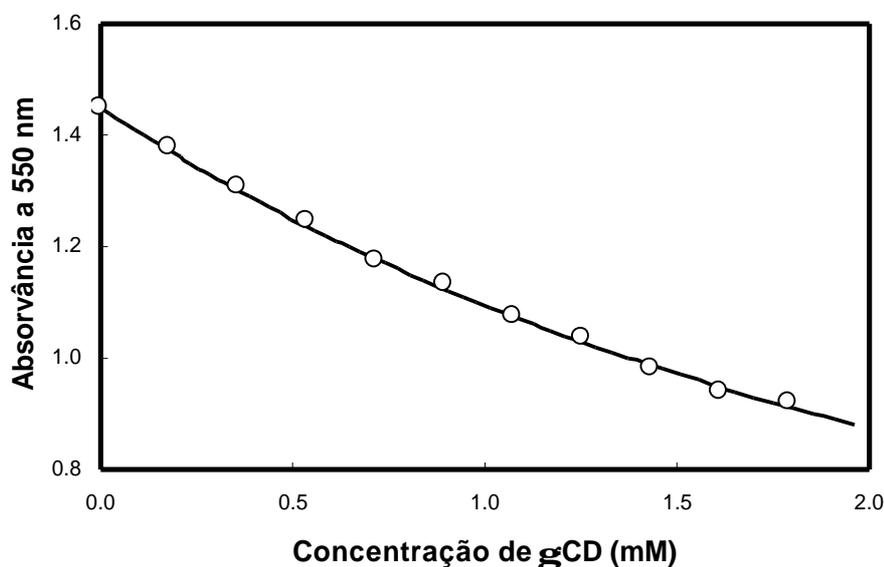


Figura 4.2 - Ajuste dos dados experimentais de absorvância em função da concentração de  $\gamma$ -CD, obtidos pela dosagem colorimétrica com a PHE.

O valor da constante de equilíbrio para o complexo  $\gamma$ -CD-fenolftaleína ( $K_{\gamma\text{-CD}}$ ) foi utilizado nos programas listados no anexo 3 para a determinação da concentração real de  $\beta$ -CD.

#### 4.1.1.2 - INTERFERÊNCIA DA DEXTRINA NA DOSAGEM DA $\beta$ -CD

Neste item são apresentados os resultados da dosagem de soluções padrões de dextrina, para concentrações de 5 a 150 g/L, utilizando o método de dosagem colorimétrico da fenolftaleína, conforme metodologia descrita no item 3.2.1.1.

Na tabela 4.3 estão listadas as absorvâncias obtidas para as diversas amostras padrões de dextrina. As concentrações de dextrina corrigida ( $C_{\text{DEXT corrigida}}$ ) foram calculadas considerando-se a umidade de 3,3%, determinada pelo método Karl Fisher.

Tabela 4.3 - Absorvâncias obtidas na dosagem de dextrina pelo método da PHE

$C_{\text{DEXT nominal}}$ (g/L)	$C_{\text{DEXT corrigida}}$ (g/L)	Absorvância
0	0,00	1,430
5	4,84	1,401
10	9,67	1,370
25	24,18	1,274
50	48,35	1,168
75	72,53	1,050
100	96,70	0,970
125	120,88	0,905
150	145,05	0,870

O valor da constante de equilíbrio do complexo dextrina-fenolftaleína ( $K_{\text{dext}}$ ), usado nos programas listados no anexo 3, para a determinação da concentração real de  $\beta$ -CD, foi de  $47,21 \text{ M}^{-1}$ , obtido pelo ajuste dos dados experimentais de absorvância em função da concentração de dextrina, usando a equação 8.10 como modelo estimativo. Substituindo o valor de  $K_{\text{dext}}$  e da concentração de fenolftaleína nas condições de dosagem (a) na equação 3.1, obtém-se:

$$C_{\text{DEXT}} = 0,5016 (1 - \text{ABS}/\text{ABS}_0) (1 + 423,6391 \text{ABS}_0/\text{ABS}) \quad (r = 0,9975) \quad (4.3)$$

onde:

$$C_{\text{DEXT}} = \text{concentração de dextrina em g/L}$$

Na figura 4.3 são mostrados os dados experimentais da dosagem das amostras padrões de dextrina, pelo método colorimétrico da fenolftaleína, ajustados à equação 4.3.

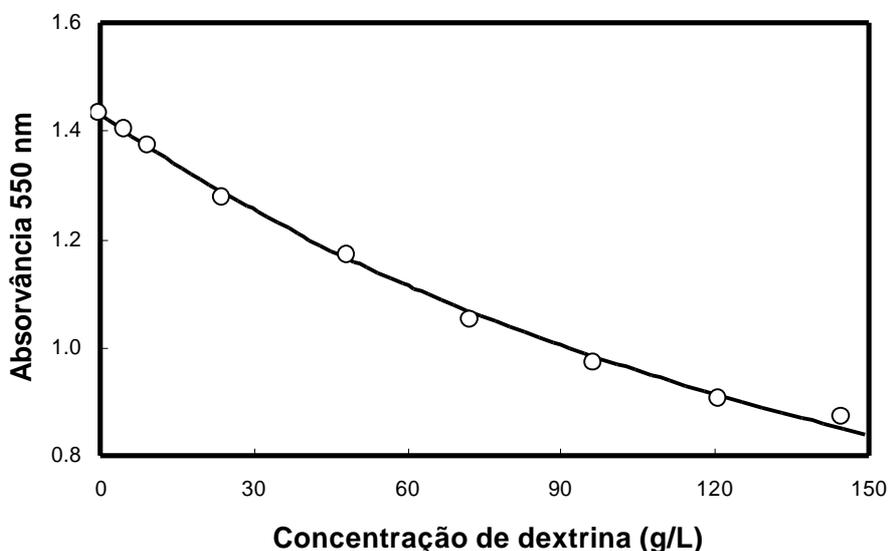


Figura 4.3 - Ajuste dos dados experimentais de absorvância em função da concentração de dextrina, obtidos pelo método de dosagem colorimétrico da PHE.

Os valores encontrados para as constantes de equilíbrio para os complexos  $\beta$ -ciclodextrina-fenolftaleína,  $\gamma$ -ciclodextrina-fenolftaleína e dextrina-fenolftaleína, estão de acordo com os resultados obtidos por HAMON & MORAES (1990), ou seja,  $17372,14 \text{ M}^{-1}$ ,  $1837,70 \text{ M}^{-1}$  e  $43,83 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente.

#### 4.1.2 - CURVA PADRÃO PARA DOSAGEM DE $\gamma$ CD

Neste item encontram-se os valores de absorvância lida a 620 nm em função da concentração de  $\gamma$ CD, para as concentrações de 0 a 2 mM, obtidos segundo metodologia descrita no item 3.2.1.2. Os valores são apresentados na tabela 4.4 e o ajuste dos dados experimentais à equação 4.4 é mostrado na figura 4.4.

A dosagem de  $\gamma$ CD, na presença de  $\beta$ -CD e dextrina, pelo método colorimétrico do Verde de Bromocresol (BCG) é possível, pois este método é aproximadamente 266 vezes mais sensível para a  $\gamma$ CD do que para a  $\beta$ -CD, e a variação entre a absorvância para amostras na presença e ausência de elevada concentração de dextrina é muito pequena e linear numa faixa de concentração de dextrina de 0 a 150 g/L, como foi verificado por HAMON & MORAES (1990). Portanto, na determinação da concentração real de  $\gamma$ CD, utilizando-se a equação 4.4, é suficiente descontar-se a concentração aparente de  $\gamma$ CD do ponto zero.

Tabela 4.4 - Absorvâncias obtidas na dosagem de  $\gamma$ -CD pelo método do BCG

$C_{\gamma\text{-CD}}$ (mM)	$C_{\gamma\text{-CD}}$ corrigida	ABS (620 nm)	$C_{\gamma\text{-CD}}$ (mM)	$C_{\gamma\text{-CD}}$ corrigida	ABS 620 nm
0,0	0,0000	0,282	1,1	0,9846	0,402
0,1	0,0895	0,294	1,2	1,0741	0,414
0,2	0,1790	0,306	1,3	1,1636	0,425
0,3	0,2685	0,316	1,4	1,2531	0,435
0,4	0,3580	0,328	1,5	1,3427	0,448
0,5	0,4476	0,340	1,6	1,4322	0,458
0,6	0,5371	0,354	1,7	1,5217	0,463
0,7	0,6266	0,361	1,8	1,6112	0,474
0,8	0,7161	0,372	1,9	1,7007	0,481
0,9	0,8056	0,382	2,0	1,7902	0,491
1,0	0,8951	0,392			

A reta ajustada, obtida pela regressão linear entre a absorvância (ABS) e a concentração de  $\gamma$ -CD foi:

$$C_{\gamma\text{-CD}} = 8,5251 \text{ ABS} - 2,44075 \quad (r = 0,9981) \quad (4.4)$$

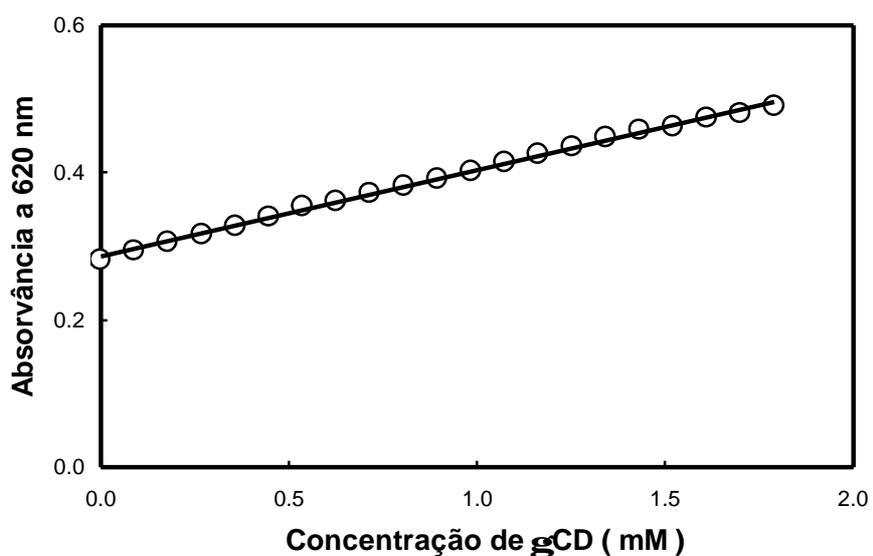


Figura 4.4 - Curva padrão para a dosagem de  $\gamma$ -CD pelo método colorimétrico do Verde de Bromocresol (BCG).

#### 4.1.3 - CURVA PADRÃO PARA A DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A tabela 4.5 apresenta um exemplo dos dados de calibração para a determinação do teor de proteína da enzima CGTase. Os dados de absorvância, lida a 595 nm, em função da concentração de proteína, para as concentrações 0 a 0,1 mg/mL, obtidas de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.2, foram ajustados por um polinômio de grau 2, por reproduzir mais adequadamente os pontos próximos à origem.

Tabela 4.5 - Absorvâncias obtidas na dosagem de proteínas pelo método de Bradford

Concentração (mg/mL)	Absorvância 595 nm
0,00	0,000
0,01	0,084
0,02	0,138
0,03	0,159
0,04	0,232
0,05	0,251
0,06	0,320
0,07	0,348
0,08	0,391
0,09	0,437
0,10	0,474

A equação 4.5 foi usada na determinação do teor de proteína das soluções enzimáticas utilizadas em determinações de atividade, purificação da enzima CGTase e sua imobilização.

$$ABS = - 6,1616 C_p^2 + 5,5022 C_p - 0,0018 \quad ( r = 0,9993 ) \quad (4.5)$$

onde:

$C_p$  = concentração de proteína expressa em mg/mL

A figura 4.5 mostra os dados experimentais de absorvância em função da concentração de proteínas, ajustados com a equação 4.5.

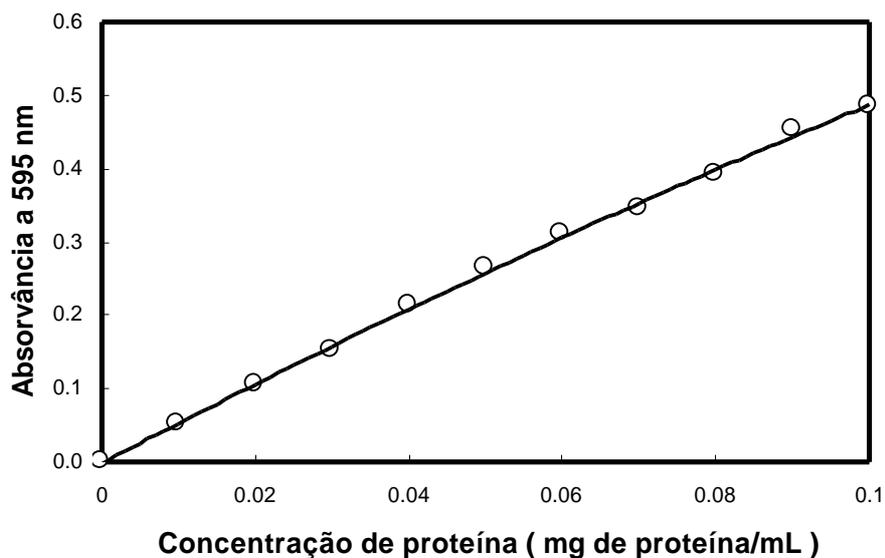


Figura 4.5 - Curva padrão para a dosagem de proteínas pelo método colorimétrico de Bradford.

#### 4.1.3.1 - INTERFERÊNCIA DE CDs NA DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD

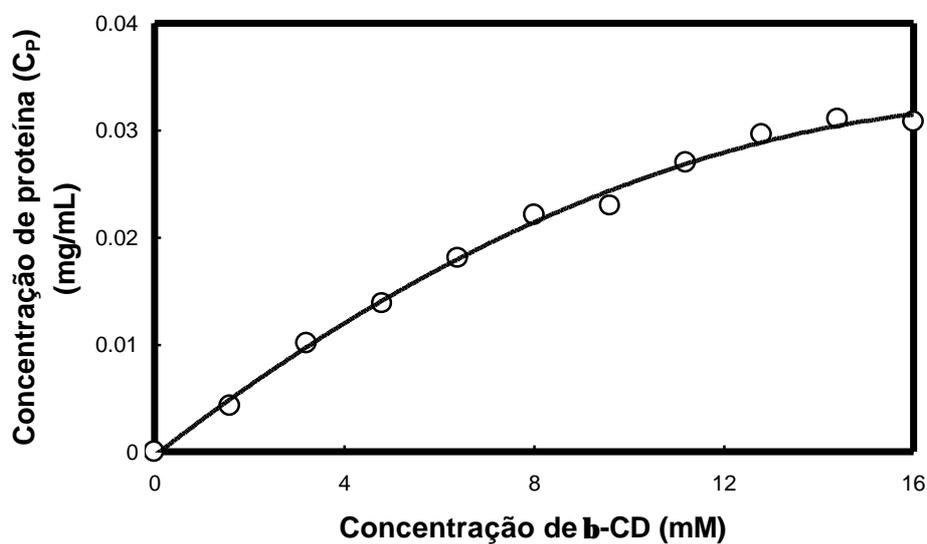
A dosagem de proteínas pelo método colorimétrico de Bradford, na presença de elevadas concentrações de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, fornece concentrações mais elevadas que as reais. Esta interferência foi verificada dosando amostras conhecidas de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD na ausência de proteínas, respectivamente nas faixas de 0 a 16 mM e 0 a 180 mM, pelo método de Bradford. A tabela 4.6 apresenta as absorvâncias lidas a 595 nm em função das concentrações de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, bem como as concentrações aparentes de proteínas, obtidas utilizando-se a curva padrão representada pela equação 4.6, construída segundo a metodologia descrita no item 3.2.2.

$$ABS = - 3,5703 C_P^2 + 3,6346 C_P - 0,0036 \quad (r = 0,9995) \quad (4.6)$$

As figuras 4.6 e 4.7 mostram graficamente as concentrações aparentes de proteína, devido à presença de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD na amostra, bem como as respectivas curvas de ajuste, ou seja, equações 4.7 e 4.8.

Tabela 4.6 - Absorvância a 595 nm em função da concentração de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, obtidas pelo método de dosagem colorimétrico de Bradford

$C_{\beta\text{-CD}}$ (g/L)	ABS a 595 nm	$C_P$ (mg/mL)	$C_{\gamma\text{-CD}}$ (g/L)	ABS a 595 nm	$C_P$ (mg/mL)
0	0	0	0	0	0
1,816	0,012	0,00431	23,349	0,049	0,01468
3,632	0,033	0,01017	46,698	0,084	0,02470
5,448	0,046	0,01383	70,047	0,108	0,03169
7,264	0,061	0,01809	93,396	0,141	0,04147
9,080	0,075	0,02211	116,745	0,167	0,04933
10,896	0,078	0,02297	140,094	0,185	0,05484
12,712	0,092	0,02702	163,443	0,215	0,06419
14,528	0,101	0,02964	186,792	0,225	0,06735
16,344	0,106	0,03110	210,141	0,269	0,08153
18,16	0,105	0,03008	233,490	0,270	0,08186

Figura 4.6 - Concentração aparente de proteína ( $C_P$ ) em função da concentração de  $\beta$ -CD na amostra.

$$C_P = -9 \times 10^{-5} C_{\beta\text{-CD}}^2 + 0,0035 C_{\beta\text{-CD}} - 0,0004 \quad (r = 0,9979) \quad (4.7)$$

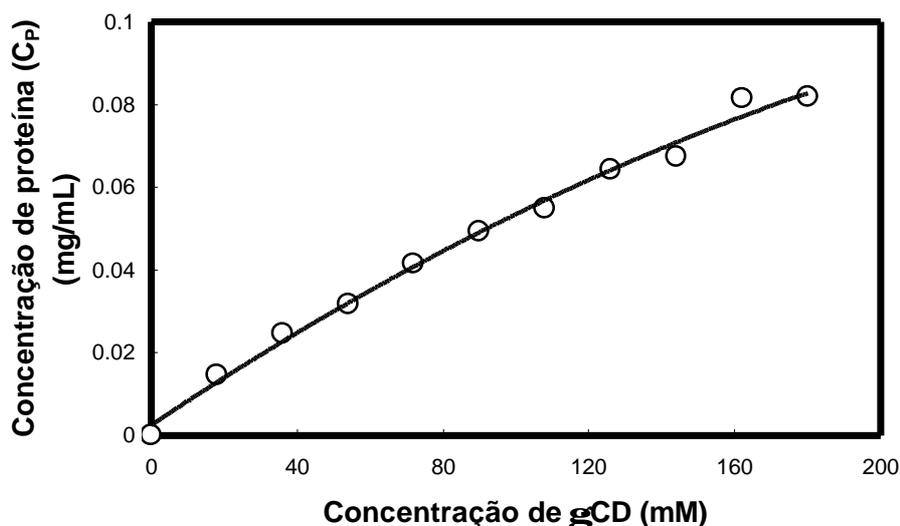


Figura 4.7 - Concentração aparente de proteína ( $C_P$ ) em função da concentração de  $\gamma$ -CD presente na amostra.

$$C_P = -8 \times 10^{-7} C_{\gamma\text{-CD}}^2 + 0,0006 C_{\gamma\text{-CD}} + 0,0025 \quad (r = 0,9964) \quad (4.8)$$

## 4.2 - CARACTERIZAÇÃO DA SÍLICA DE POROSIDADE CONTROLADA

Neste item apresenta-se os resultados obtidos na caracterização da sílica de porosidade controlada (SPC), utilizada tanto como suporte na imobilização da enzima ciclodextrina glicosiltransferase, como utilizada no estudo hidrodinâmico do reator de leito fluidizado. A caracterização foi feita quanto ao diâmetro médio das partículas (metodologia descrita no item 3.2.3.1), densidade cristalina (metodologia descrita no item 3.2.3.2), porosidade interna da partícula (item 3.2.3.3) e densidade da partícula seca (item 3.2.3.4).

### 4.2.1 - DIÂMETRO MÉDIO DAS PARTÍCULAS

Com o peneiramento de 10 g de SPC por 5 min constatou-se que os MESH 80 e 100 podiam ser excluídos da análise granulométrica, pois as frações mássicas dessas peneiras eram desprezíveis.

Foram realizadas duas análises granulométricas, peneirando 10 g de SPC por 2 minutos e por 5 minutos, até peso constante das peneiras. Com as frações mássicas obtidas em cada peneira, determinou-se o diâmetro médio das partículas utilizando-se a equação 3.2. Nas tabelas 4.7 e 4.8 são mostradas as frações mássicas obtidas em cada peneira, nos dois ensaios realizados.

Tabela 4.7 - Frações mássicas retidas nas peneiras, após peneiramento de 10 g de SPC por 2 minutos, até peso constante

MESH	Abertura (mm)	dpi (mm)	Fração Mássica (xi)	xi / dpi
20	0,833	-	0,0000	0,0000
28	0,589	0,711	0,0013	0,0018
32	0,495	0,542	0,2033	0,3751
35	0,417	0,456	0,3255	0,7138
42	0,351	0,384	0,3647	0,9497
48	0,295	0,323	0,0625	0,1935
60	0,246	0,271	0,0327	0,1209
FUNDO	0,000	0,123	0,0100	0,0813
$\Sigma$			1,0000	2,4362

A substituição do somatório de xi / dpi na equação 3.2 fornece um diâmetro médio das partículas (dp) de 0,41 mm.

Tabela 4.8 - Frações mássicas retidas nas peneiras, após peneiramento de 10 g de SPC por 5 minutos, até peso constante

MESH	Abertura (mm)	dpi (mm)	Fração Mássica (xi)	xi / dpi
20	0,833	-	0,0000	0,0000
28	0,589	0,711	0,0031	0,0043
32	0,495	0,542	0,2875	0,5304
35	0,417	0,456	0,3475	0,7621
42	0,351	0,384	0,2784	0,7249
48	0,295	0,323	0,0524	0,1623
60	0,246	0,271	0,0259	0,0957
FUNDO	0,000	0,123	0,0053	0,0429
$\Sigma$			1,0000	2,3225

A substituição do somatório de  $x_i / d_{pi}$  na equação 3.2 fornece um diâmetro médio das partículas ( $d_p$ ) de 0,43 mm.

Como os diâmetros obtidos nos dois ensaios ficaram muito próximos, foi adotada a média aritmética desses dois valores como diâmetro médio das partículas de SPC, ou seja,  $d_p = 0,42$  mm.

ZANIN (1989) determinou o diâmetro médio das partículas de sílica de porosidade controlada, adquirida da Corning Glass Works, obtendo um valor médio de 0,45 mm, estando portanto muito próximo ao valor obtido para a SPC da Sucrierie Vanciennes, utilizada neste trabalho.

A figura 4.8 mostra a distribuição de diâmetro das partículas de sílica de porosidade controlada, obtida pela análise granulométrica.

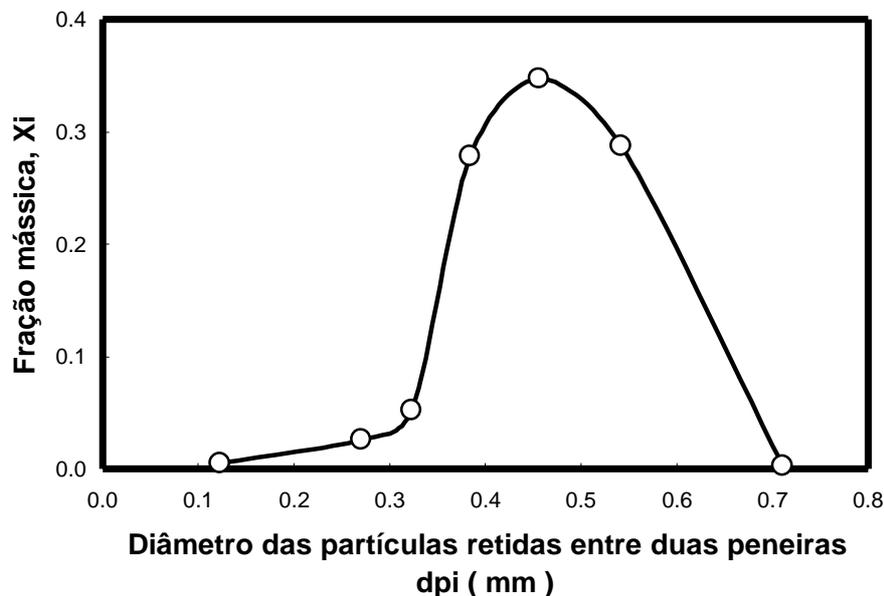


Figura 4.8 - Distribuição de diâmetro das partículas de sílica de porosidade controlada (SPC), obtida pela análise granulométrica.

#### 4.2.2 - DENSIDADE CRISTALINA ( $r_s$ )

A tabela 4.9 mostra os resultados obtidos na determinação da densidade cristalina da sílica de porosidade controlada, calculada pela da equação 3.3. O valor médio obtido das cinco determinações foi de 2,1815 g/cm<sup>3</sup>. ZANIN (1989) obteve um valor de 2,178 g/cm<sup>3</sup>, para a sílica de porosidade controlada da Corning Glass Works.

Tabela 4.9 - Resultados obtidos na determinação da densidade cristalina da SPC

TESTE	$V_b$ ( mL )	$M_s$ ( g )	$V_a$ ( mL )	$V_s = V_b - V_a$ ( $cm^3$ )	$\rho_s$ ( $g/cm^3$ )
1	24,9456	2,6038	23,7555	1,1901	2,1879
2	24,9198	1,8434	24,0664	0,8534	2,1601
3	24,9381	2,9125	23,6187	1,3194	2,2074
4	24,9585	3,3070	23,4209	1,5376	2,1508
5	25,2164	2,5196	24,0719	1,1445	2,2015
$\rho_s$ ( médio )					$2,1815 \pm 0,025$

#### 4.2.3 - POROSIDADE INTERNA DA PARTÍCULA ( $\epsilon_p$ ) E DENSIDADE SECA ( $\rho_p$ )

Na tabela 4.10 apresenta-se os resultados experimentais obtidos na determinação da porosidade interna da partícula ( $\epsilon_p$ ) e da densidade da partícula seca ( $\rho_p$ ).

Tabela 4.10 - Resultados obtidos na determinação da porosidade interna da partícula ( $\epsilon_p$ ) e da densidade seca da SPC ( $\rho_p$ ).

Teste	$P_a$ ( g )	$M_s$ ( g )	$V_{zp}$ ( $cm^3$ )	$V_s$ ( $cm^3$ )	$V_p$ ( $cm^3$ )	$\epsilon_p$	$\rho_p$ ( $g/cm^3$ )
1	2,8043	4,5376	2,8132	2,0800	4,8932	0,5749	0,9274
2	2,7539	4,5108	2,7627	2,0678	4,8305	0,5719	0,9339
3	2,7898	4,5242	2,7987	2,0739	4,8726	0,5744	0,9284
Valor médio						$0,5737 \pm 0,002$	$0,9299 \pm 0,004$

Como observa-se na tabela 4.10, obteve-se para a porosidade interna da partícula, calculada pela equação 3.4, um valor médio de 0,574; enquanto o valor médio da densidade seca da partícula, calculada pela equação 3.5 foi de 0,930  $g/cm^3$ , valores esses também de acordo com os determinado por ZANIN (1989), ou seja,  $\epsilon_p = 0,566$  e  $\rho_p = 0,939 g/cm^3$ .

### 4.3 - ESTUDO HIDRODINÂMICO DO REATOR DE LEITO FLUIDIZADO

Neste item apresenta-se os resultados experimentais da altura do leito fluidizado em função da velocidade superficial do fluido, realizado conforme metodologia descrita no item 3.2.4.

Com os dados experimentais de altura do leito fluidizado calculou-se a porosidade do leito expandido utilizando-se a equação 2.1, onde o valor de  $\rho_p$  utilizado, foi o determinado no item 4.2.3. Estes resultados de velocidade superficial do fluido em função da porosidade do leito foram ajustados pela correlação de Richardson e Zaki (equação 2.2) e, são mostrados na tabela 4.11 e figura 4.9.

Tabela 4.11 - Velocidade superficial do fluido ( $u$ ) em função da porosidade do leito fluidizado ( $\epsilon$ )

Vazão média (mL/min)	Altura média do leito expandido, (cm)	Porosidade do leito fluidizado, ( $\epsilon$ )	Velocidade superficial do fluido, $u$ (cm/s)
0,0	25,3	0,4695	0,0000
1,2	25,3	0,4695	0,0103
2,0	25,3	0,4695	0,0169
3,2	25,4	0,4716	0,0269
5,3	25,3	0,4702	0,0441
6,2	25,8	0,4798	0,0516
7,3	26,3	0,4903	0,0605
8,4	26,9	0,5011	0,0699
8,7	27,2	0,5060	0,0721
12,0	28,8	0,5345	0,0998
16,9	30,9	0,5657	0,1403
18,3	31,3	0,5717	0,1525
21,1	32,3	0,5845	0,1758
31,3	35,2	0,6184	0,2607
39,2	37,3	0,6399	0,3259
47,0	39,6	0,6614	0,3910
54,2	41,9	0,6794	0,4507
64,0	45,2	0,7029	0,5325
74,8	49,2	0,7274	0,6226
83,3	52,8	0,7460	0,6933
93,0	57,5	0,7666	0,7738
106,7	64,6	0,7922	0,8875
114,0	69,4	0,8065	0,9485
122,3	75,9	0,8232	1,0178
135,0	87,0	0,8457	1,1232
140,0	92,3	0,8546	1,1648

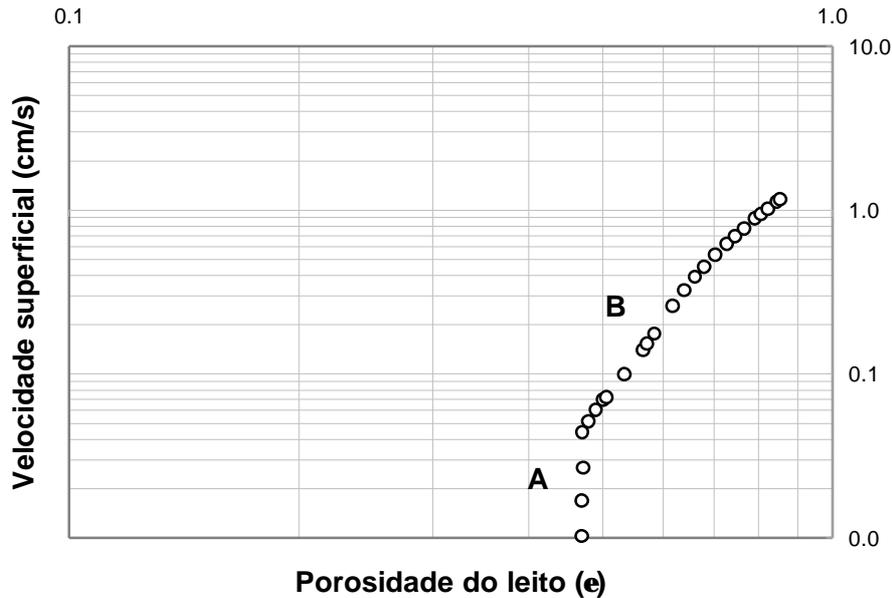


Figura 4.9 - Relação entre a porosidade do leito fluidizado e a velocidade superficial do fluido, ajustada pela correlação de Richardson e Zaki (equação 2.2).

Na figura 4.9, a região A corresponde à região de leito fixo, enquanto a região B, corresponde à região de leito fluidizado. Os pontos finais da região B, ajustados à equação 2.2 possibilitaram a determinação do coeficiente de expansão experimental ( $n$ ) e da velocidade terminal corrigida da partícula ( $u_{tc}$ ). Com a substituição deste valor na equação 2.3, usando o  $d_p$  determinado no item 4.2.1 e o  $d_i$  igual a 15,97 mm, calculou-se a velocidade terminal da partícula ( $u_t$ ). A velocidade mínima de fluidização ( $u_{mf}$ ) foi determinada pela interseção das retas, que se ajustam aos pontos das regiões A e B.

A solução de dextrina 100 g/L a 50°C possui um densidade igual a 1,022 g/cm<sup>3</sup> e uma viscosidade igual a 0,86 cP, sendo que a água a 22°C possui uma densidade igual a 0,9978 g/cm<sup>3</sup> e uma viscosidade igual a 1 cP. Estas propriedades físicas estão suficientemente próximas para justificar a escolha da água à temperatura ambiente, como fluido para estudo da expansão do leito de partículas sob condições de fluidização, permitindo economizar a dextrina que é um material importado.

Os valores teóricos dos parâmetros  $n$ ,  $u_t$  e  $u_{mf}$  foram calculados utilizando-se as equações 2.6, 2.8 e 2.11, respectivamente, onde:

$$d_i = 1,597 \text{ cm}$$

$$g = 980 \text{ cm/s}^2$$

$$\mu (22^\circ\text{C}) = 0,01 \text{ g/(cm.s)}$$

$$\rho (22^\circ\text{C}) = 0,9978 \text{ g/cm}^3$$

$$\rho_{ap} = 1,5024 \text{ g/cm}^3$$

Os valores de  $d_p$ ,  $\rho_s$  e  $\varepsilon_p$  utilizados, foram os determinados nos itens 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3 e, no cálculo do número de Reynolds ( $Re_p$ ) utilizou-se o valor de  $u_t$  experimental.

A tabela 4.12 apresenta os resultados experimentais obtidos e sua comparação com os valores teóricos.

Tabela 4.12 - Comparação entre os valores experimentais e “teóricos” dos parâmetros  $u_t$  (velocidade terminal da partícula),  $u_{mf}$  (velocidade mínima de fluidização) e  $n$  (coeficiente de expansão do leito fluidizado).

Parâmetro	Valor Experimental	Valor “teórico”	Desvio (%)
$u_t$ (cm/s)	2,346	3,184	35,7
$u_{mf}$ (cm/s)	0,045	0,051	13,3
$n$	3,98	3,92	1,5

Como pode-se observar na tabela 4.12, os valores “teóricos” obtidos por meio das correlações de Richardson e Zaki, para a determinação da velocidade mínima de fluidização e do coeficiente de expansão, se aproximaram satisfatoriamente dos resultados experimentais.

O cálculo da velocidade terminal da partícula, usando correlações de Richardson e Zaki, apresentou um desvio muito alto em relação ao valor experimental. A figura 4.9 sugere o ajuste de retas diferentes para os dados de baixa e alta porosidade, assim como foi observado por RIBA & COUDERC (1977), que levariam, quando extrapoladas até  $\varepsilon$  igual a 1, a diferentes valores de  $u_t$ . Este efeito poderia justificar o grande desvio observado entre os valores experimental e “teórico” obtidos para  $u_t$ .

#### 4.4 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA DA CGTase WACKER

Na tabela 4.13 apresenta-se os resultados obtidos na dosagem de proteína da enzima CGTase pelo método colorimétrico de Bradford, conforme metodologia descrita no item 3.2.5. A concentração de proteína ( $C_p$ ) das diferentes soluções de trabalho foi determinada utilizando-se a curva padrão representada pela equação 4.5. A concentração de proteína da solução estoque foi obtida pela multiplicação da concentração de proteína da solução de trabalho pelo fator de diluição da solução estoque.

Tabela 4.13 - Concentração de proteína ( $C_P$ ) das soluções de CGTase WACKER obtidas pelo método colorimétrico de Bradford

Diluição da solução estoque	Absorvância (595 nm)	$C_P$ da solução de trabalho (mg/mL)	$C_P$ da solução estoque (mg/mL)
1 : 2	0,396	0,0793	0,1586
1 : 3	0,289	0,0564	0,1692
1 : 4	0,222	0,0427	0,1708
1 : 5	0,181	0,0346	0,1730
Valor Médio			0,1679 $\pm$ 0,006

Com os resultados mostrados na tabela 4.13 determinou-se a concentração média de proteína da enzima CGTase WACKER liofilizada como sendo 167,9 mg de proteína / g de enzima liofilizada, o que representa 16,79 % de proteína no pó.

Como pode ser observado na tabela 4.14 do item 4.6, a enzima CGTase, fornecida pela WACKER na forma liofilizada, não é totalmente homogênea quanto ao teor de proteínas, sendo portanto adotado um valor médio igual a 193,1 mg de proteína por g de enzima liofilizada.

#### 4.5 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CGT ase WACKER LIOFILIZADA

A atividade da enzima livre foi determinada conforme metodologia descrita no item 3.2.6.1. A solução estoque preparada como descrito no item 3.2.5 foi convenientemente diluída (1:700) para se obter uma concentração final de proteína da ordem de  $2,46 \times 10^{-4}$  mg/mL de solução. A concentração de  $\beta$ -CD formada,  $C_{\beta\text{-CD}}$ , em cada tempo de reação foi determinada utilizando-se o programa 1, listado no anexo 3 (item 8.3.1).

A figura 4.10 mostra os resultados obtidos de concentração de  $\beta$ -CD formada em função do tempo de reação.

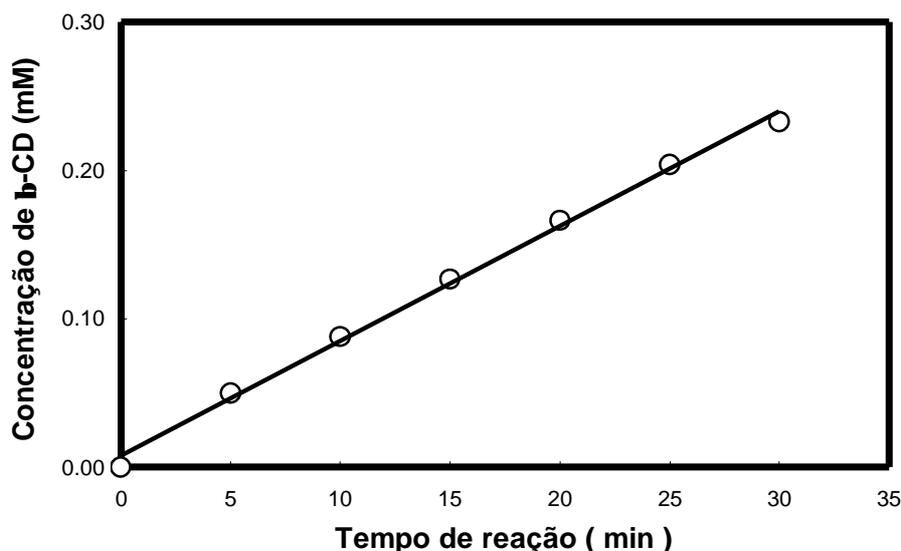


Figura 4.10 - Curva de progresso da reação de formação de  $\beta$ -CD catalisada pela enzima CGTase em solução (50°C, pH 8, substrato: dextrina 5 g/L).

Os pontos experimentais da figura 4.10 foram ajustados por regressão linear, obtendo-se a equação 4.9.

$$C_{\beta\text{-CD}} = 0,00775 t + 0,00769 \quad (r = 0,9990) \quad (4.9)$$

A substituição do coeficiente angular da equação 4.9 na equação 3.6 resulta numa atividade de 10,92  $\mu$ moles de  $\beta$ -CD/(min x mL de solução enzimática). A atividade específica da enzima, calculada pela equação 3.7, foi de 63,1 Unidades/mg de proteína, onde a concentração de proteína da solução estoque ( $C_p$ ) era igual a 0,173 mg/mL. Uma Unidade corresponde a quantidade de enzima que produz 1  $\mu$ mol de  $\beta$ -CD por minuto nas condições de reação (pH 8 e 50°C).

#### 4.6 - PURIFICAÇÃO DA ENZIMA CGTase POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE BIOESPECÍFICA (CAB)

A enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) foi purificada por cromatografia de afinidade bioespecífica, conforme metodologia descrita no item 3.2.7.

Um total de 13,92 g de enzima foi dividida em 4 alíquotas que foram purificadas por CAB, sendo aplicadas 3,48 g de enzima em cada coluna. A tabela 4.14 mostra as quantidades de proteína submetida à purificação; o teor total de proteína da enzima liofilizada (EL), determinado pelo método de Bradford, conforme descrito no item 3.2.2; os

volumes de tampão de cromatografia ( $V_{\text{tampão}}$ ) utilizados na eluição das impurezas e na eluição da CGTase, bem como as concentrações de proteína no final de cada etapa de eluição. Observa-se na tabela 4.14, pelo teor de proteína da EL, que essa enzima não é totalmente homogênea, portanto foi adotado um valor médio do teor de proteína igual a 19,31%, o que representa 193,1 mg de proteína / g de EL, diferentemente do valor obtido no item 4.4.

Tabela 4.14 - Cromatografias de afinidade bioespecífica (CAB)

CAB	1	2	3	4
EL (g) purificada	3,48	3,48	3,48	3,48
Total de proteína na EL (mg)	584,29	667,20	756,00	680,39
Total de proteína aplicada (mg)	584,29	660,53	748,44	673,59
Teor de proteína da EL (%)	16,79	19,17	21,72	19,55
Impurezas totais eluídas (mg)	132,66	224,44	250,96	262,24
CGTase total eluída (mg)	360,85	384,83	472,63	441,78
$V_{\text{tampão}}$ na eluição impurezas (mL)	742	815	775	775
$V_{\text{tampão}}$ na eluição CGTase (mL)	241	250	250	250
$C_{P \text{ final}}$ eluição impurezas (mg/mL)	0,0115	0,0018	0,0026	0,0040
$C_{P \text{ final}}$ eluição CGTase (mg/mL)	0,0555	0,0373	0,0545	0,0358

Na figura 4.11 é mostrado o perfil de atividade e do teor de proteína da CGTase purificada em função do volume de eluição. Estes resultados foram obtidos na primeira cromatografia, onde foram coletadas alíquotas de 2,5 mL, até que se observasse ausência de proteína na amostra eluída. Para as demais colunas foi coletado um único volume na eluição das impurezas e da CGTase, uma vez que já se conhecia os volumes de tampão necessários em cada etapa. As atividades nas frações que apresentaram proteína foram medidas conforme metodologia descrita no item 3.2.7.2, sendo as concentrações de  $\beta$ -CD calculadas pelo programa 1, do anexo 3.

Observa-se na figura 4.11, que a eluição da CGTase apresentou um pico após um volume de 55 mL. O teor de proteína deste pico foi de 15 mg/mL e a máxima atividade foi de 982 Unidades/mL.

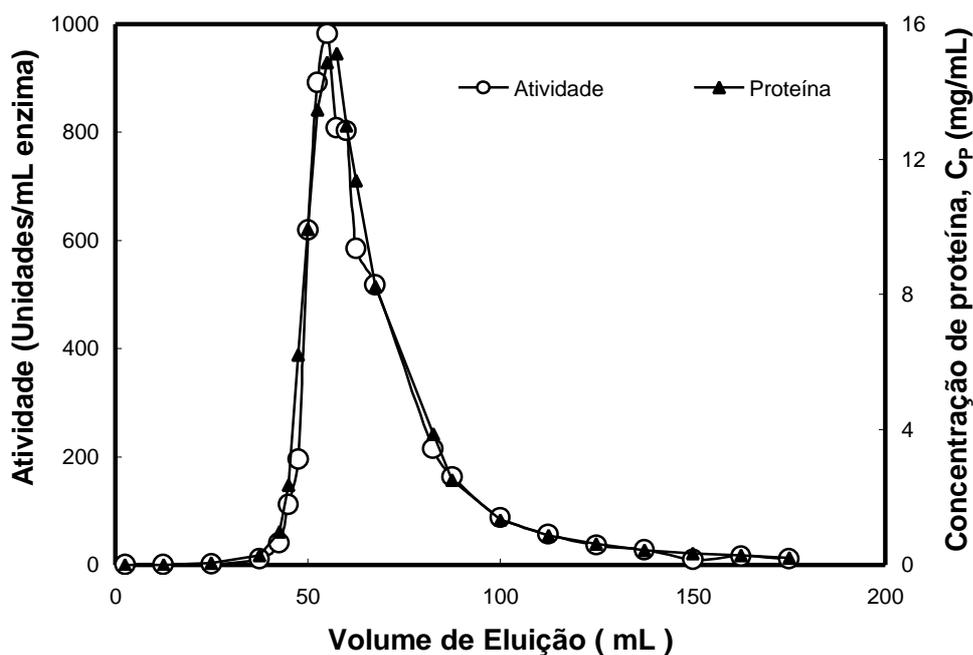


Figura 4.11 - Teor de proteína e atividade (50°C, pH 8, substrato: dextrina 5 g/L) das alíquotas coletadas na etapa de eluição da enzima CGTase na primeira cromatografia de afinidade bioespecífica.

Todas as frações que apresentaram atividade enzimática foram reunidas, obtendo-se um volume de 1000 mL de solução enzimática, com um teor de proteína igual a 1,64 mg/mL. Do total de proteína submetida à purificação, 94% foi recuperada. Com base nos resultados da purificação, determinou-se que do total de proteínas presente na enzima liofilizada, 65,3% corresponde à enzima CGTase, o que representa 11,8% de CGTase no pó.

Após a determinação da atividade da solução enzimática final (item 4.6.1), conforme a metodologia descrita no item 3.2.6.1, calculou-se a recuperação da atividade total, ou o rendimento da purificação, obtendo-se 72%, com um fator de purificação de 1,2 (tabela 4.15). BERNA et al. (1996) obtiveram para a purificação da mesma CGTase, utilizando a cromatografia de afinidade bioespecífica com  $\beta$ -CD como ligante, um rendimento de 79%, com um fator de purificação igual a 1,4.

Embora o fator de purificação obtido seja muito baixo quando comparado com os fatores obtidos por outros pesquisadores, conforme relata a literatura (item 2.2.3), este, é consistente com o fato de que essa CGTase representa 65,3% do total de proteínas no material de partida, em consequência desta enzima ser uma proteína recombinante, excretada no meio de cultura.

Tabela 4.15 - Purificação da CGTase do *Bacillus alcalofílico* clonada em *E. coli*, por cromatografia de afinidade bioespecífica, utilizando  $\beta$ -CD como ligante.

Enzima Liofilizada	Ae (Unidades/mg)	Total de Proteína (mg)	Atividade Total (Unidades)	% de atividade recuperada	Fator de Purificação
Bruta	63,10	2666,85	168278,23	100	1
Purificada	73,80	1636,63	120783,29	72	1,2
Impurezas	0	870,30	0	0	0

#### 4.6.1 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CGTase WACKER PURIFICADA POR CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE BIOESPECÍFICA (CAB)

A atividade enzimática da CGTase WACKER purificada foi determinada utilizando-se a metodologia descrita no item 3.2.6.1. A reação de ciclização, catalisada pela CGTase, foi acompanhada determinando-se a quantidade de  $\beta$ -CD produzida pelo método de dosagem colorimétrica da fenoltaleína, como descrito no item 3.2.1.1, sendo a concentração desta ciclodextrina calculada utilizando-se o programa 1, listado no anexo 3.

A reação foi conduzida a 50°C e pH 8, utilizando-se uma solução de dextrina 10 g/L como substrato. A solução enzimática, com um teor de proteína de 1,64 mg/mL, foi diluída 6800 vezes com o objetivo de se ajustar a concentração em aproximadamente  $2,46 \times 10^{-4}$  mg/mL.

A figura 4.12 mostra a formação de  $\beta$ -CD em função do tempo de reação. Esses dados experimentais foram ajustados por regressão linear, obtendo-se a equação 4.10. Com a substituição do coeficiente angular desta reta nas equações 3.6 e 3.7, obteve-se a atividade enzimática e a atividade específica da CGTase purificada. Na equação 3.7,  $C_P$  é igual a 1,64 mg/mL e na equação 3.6, D é igual a 6800.

$$C_{\beta\text{-CD}} = 0,0089 t + 0,0106 \quad (r = 0,9951) \quad (4.10)$$

onde:

$C_{\beta\text{-CD}}$  = concentração de  $\beta$ -CD expressa em mM

t = tempo de reação em minutos

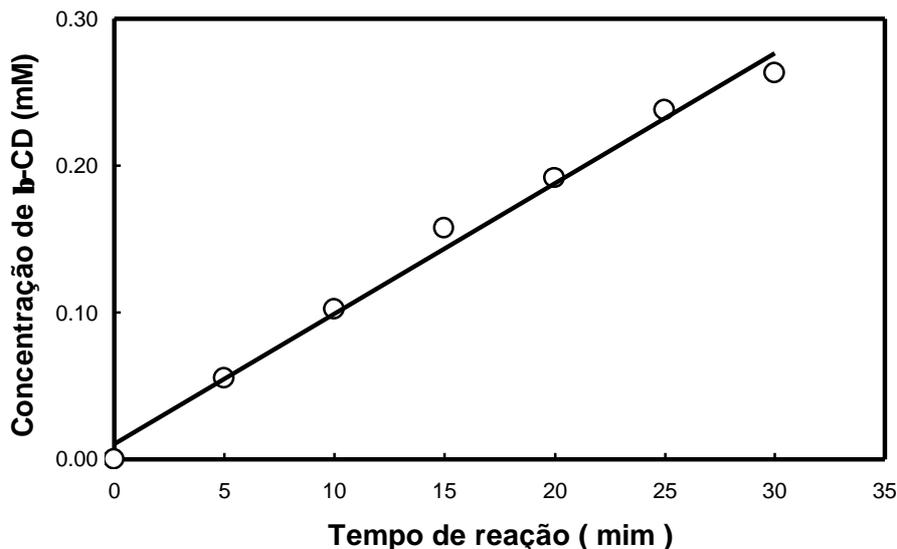


Figura 4.12 - Curva de progresso da reação de produção de  $\beta$ -CD, catalisada pela enzima (em solução) CGTase purificada por CAB ( 50°C, pH 8, substrato: dextrina 5 g/L).

A CGTase purificada apresentou uma atividade de 121,04 Unidades/mL de solução enzimática e uma atividade específica ( $A_e$ ) de 73,80 Unidades/mg de proteína.

A atividade da enzima CGTase purificada, quanto à produção de  $\gamma$ -CD, foi determinada segundo a metodologia descrita no item 3.2.6.1, com modificação nos tempos de reação, ou seja, nos primeiros 5 minutos a reação foi acompanhada em intervalos de 1 minuto e em seguida em intervalos de 5 minutos até o tempo final de 30 minutos. A atividade foi determinada para 9 diluições da solução estoque de enzima 1,64 mg/mL, a saber: 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:600, 1:1000, 1:2000, 1:3000 e 1:4000. As figuras 4.13, 4.14 e 4.15 mostram a formação de  $\gamma$ -CD em função do tempo de reação para cada diluição da solução estoque, bem como as retas que ajustaram a porção linear dos dados experimentais obtidos.

Todas as dosagens de  $\gamma$ -CD foram realizadas pelo método colorimétrico do Verde de Bromocresol, conforme metodologia descrita no item 3.2.1.2, sendo as concentrações determinadas pela curva padrão representada pela equação 4.4.

A tabela 4.16 mostra as atividades (  $A$  ) e as atividades específicas (  $A_e$  ) da CGTase determinadas pelas equações 3.6 e 3.7, utilizando-se os coeficientes angulares (  $b$  ) das retas mostradas nas figuras 4.13, 4.14 e 4.15.

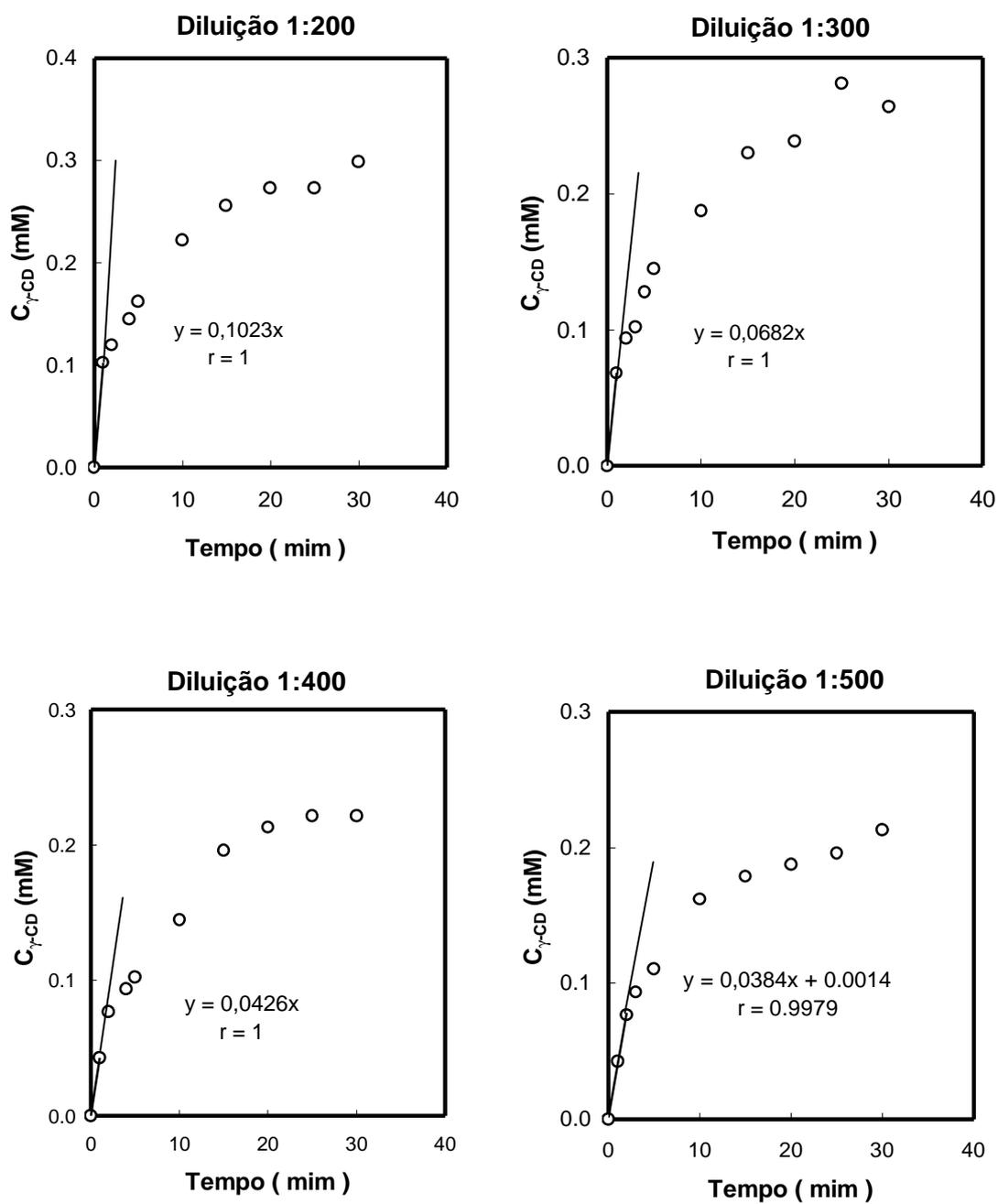


Figura 4.13 - Formação de  $\gamma$ -CD em função do tempo de reação para as diluições de 1:200, 1:300, 1:400 e 1:500 da solução enzimática estoque 1,64 mg/mL, bem como o ajuste da porção linear dos dados experimentais.

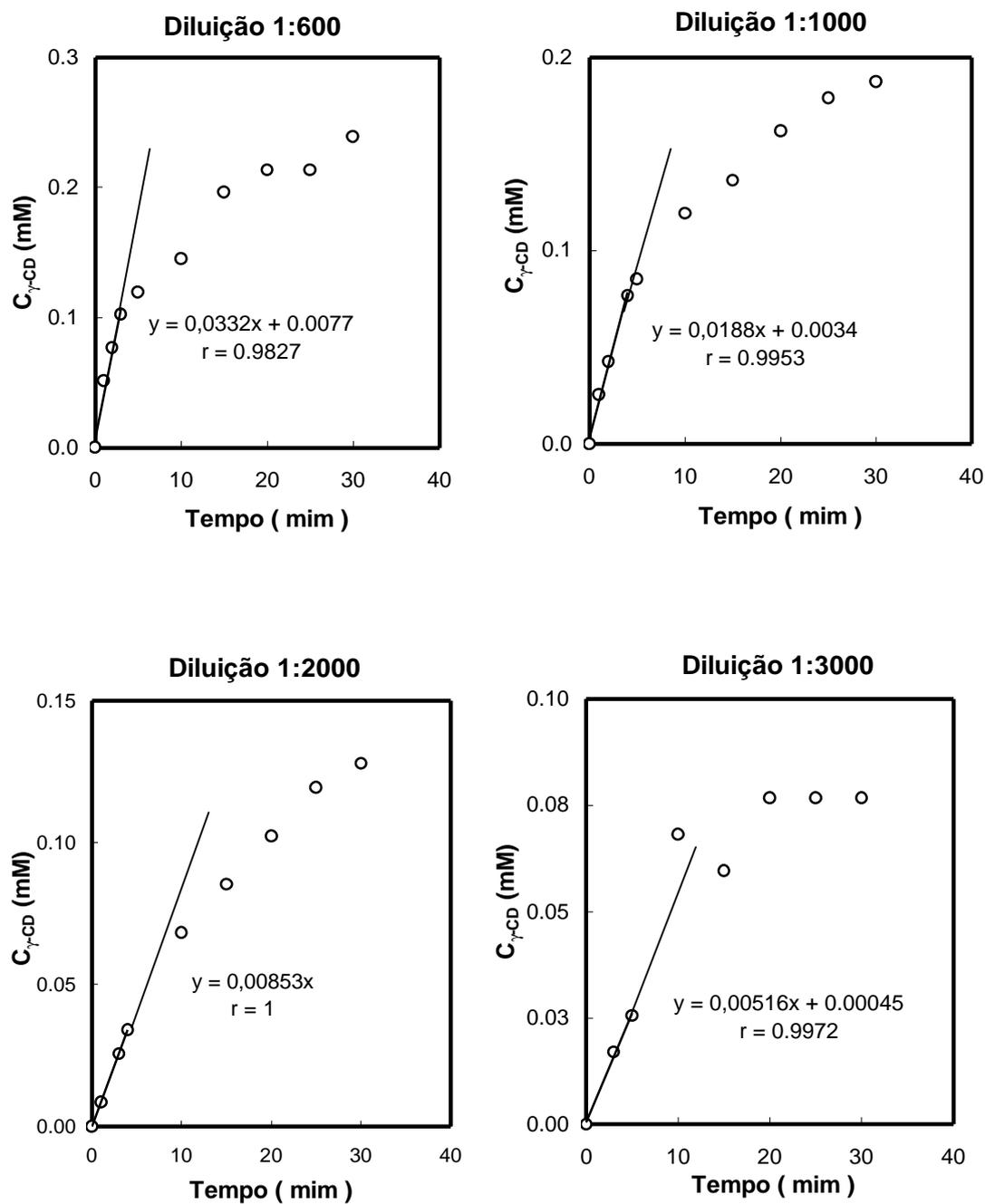


Figura 4.14 - Formação de  $\gamma$ -CD em função do tempo de reação para as diluições de 1:600, 1:1000, 1:2000 e 1:3000 da solução enzimática estoque 1,64 mg/mL, bem como o ajuste da porção linear dos dados experimentais.

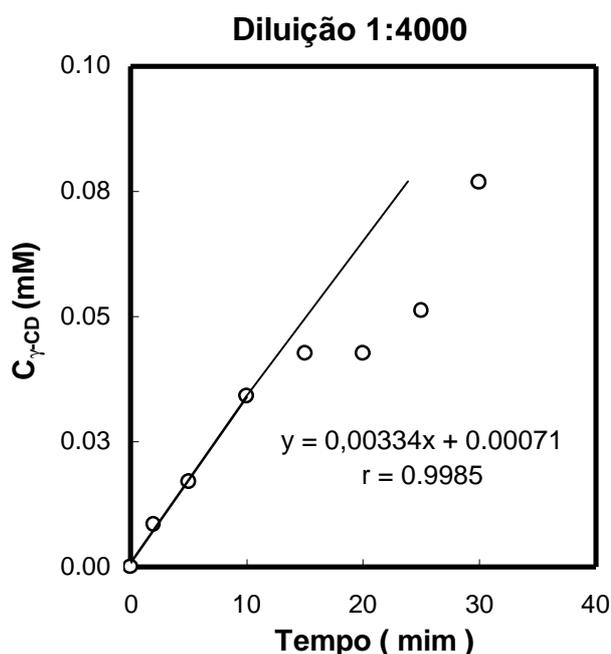


Figura 4.15 - Formação de  $\gamma$ -CD em função do tempo de reação para a diluição de 1:4000 da solução enzimática estoque 1,64 mg/mL, bem como o ajuste da porção linear dos dados experimentais.

A tabela 4.17 e a figura 4.16 mostram o comportamento da velocidade de formação de  $\gamma$ -CD em função da quantidade de proteína presente no teste. Os resultados mostraram uma boa linearidade, sendo ajustados pela reta representada pela equação 4.11, a partir da qual foi possível determinar-se a atividade específica da CGTase (coeficiente angular da reta), quanto à formação de  $\gamma$ -CD, como sendo 24,91  $\mu$ moles de  $\gamma$ -CD / (min x mg de proteína).

$$V_{\gamma\text{-CD}} = 24,91 m_p - 0,0049 \quad (r = 0,9970) \quad (4.11)$$

onde:

$m_p$  = massa total de proteína no ensaio (mg)

$V_{\gamma\text{-CD}}$  = velocidade de formação de  $\gamma$ -CD ( $\mu$ moles  $\gamma$ -CD/min)

Tabela 4.16 - Determinação das atividades (A) e das atividades específicas ( $A_e$ ) da CGTase quanto à produção de  $\gamma$ -CD, para as diluições ( D ) 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:600, 1:1000, 1:2000, 1:3000 e 1:4000 da solução enzimática estoque (SE), cuja concentração é igual a 1,64 mg/mL

D	b ( $\mu\text{moles } \gamma\text{-CD}/\text{min} \times \text{mL}$ )	A ( $\mu\text{moles } \gamma\text{-CD}/\text{min mL}_{\text{SE}}$ )	$A_e$ ( $\mu\text{moles } \gamma\text{-CD}/\text{min} \times \text{mg}$ )
1:200	0,10230	40,92	24,95
1:300	0,06820	40,92	24,95
1:400	0,04260	34,08	20,78
1:500	0,03840	38,40	23,41
1:600	0,03320	39,84	24,29
1:1000	0,01880	37,60	22,93
1:2000	0,00853	34,12	20,80
1:3000	0,00516	30,96	18,88
1:4000	0,00334	26,72	16,29

Tabela 4.17 - Velocidade de formação de  $\gamma$ -CD ( $V_{\gamma\text{-CD}}$ ) em função da quantidade total de proteína ( $m_P$ ) presente no ensaio.

$m_P$ (mg)	$V_{\gamma\text{-CD}}$ ( $\mu\text{moles } \gamma\text{-CD} / \text{min}$ )
$1,23 \times 10^{-2}$	0,3069
$8,20 \times 10^{-3}$	0,2046
$6,15 \times 10^{-3}$	0,1278
$3,28 \times 10^{-3}$	0,0768
$2,73 \times 10^{-3}$	0,0664
$1,64 \times 10^{-3}$	0,0376
$8,20 \times 10^{-4}$	0,0171
$5,47 \times 10^{-4}$	0,0103
$4,10 \times 10^{-4}$	0,0067

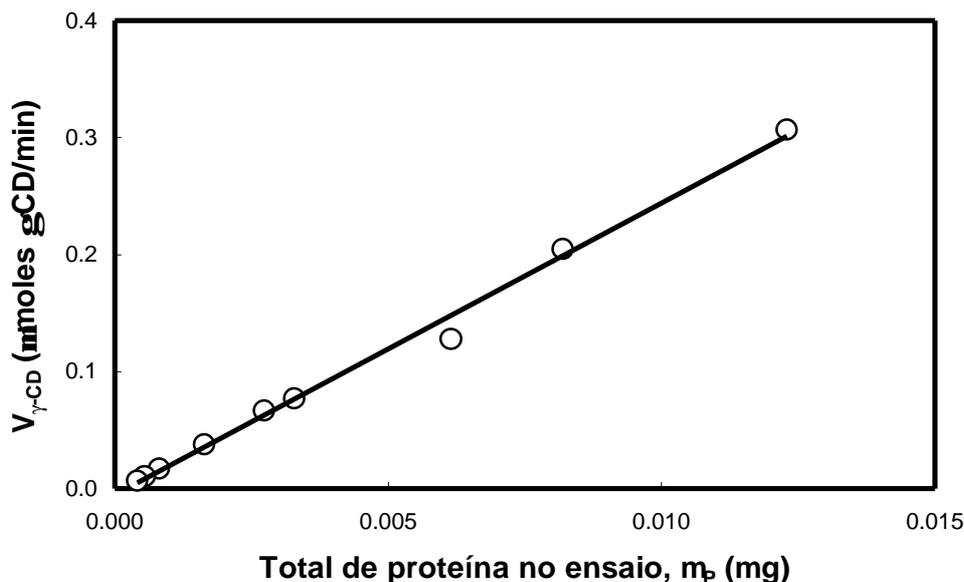


Figura 4.16 - Velocidade de formação de  $\gamma$ -CD ( $V_{\gamma\text{-CD}}$ ) em função da quantidade total de proteína ( $m_p$ ) presente no ensaio.

#### 4.7 - IMOBILIZAÇÃO DA CGTase PURIFICADA PELO MÉTODO DA LIGAÇÃO COVALENTE

A enzima CGTase purificada por cromatografia de afinidade bioespecífica foi imobilizada em sílica de porosidade controlada (SPC) utilizando-se o método da ligação covalente, com glutaraldeído como reagente bifuncional, conforme metodologia descrita no item 3.2.8.

Partindo-se de 100 g de SPC obteve-se 97,378 g de suporte silanizado, seco em estufa a 105°C por 15 horas. Após ativação com glutaraldeído, a quantidade de suporte ativado seco por sucção oferecido para a imobilização foi de 164,368 g, com uma umidade de 41,15%, correspondendo portanto a 96,7306 g de suporte ativado seco ( $M_{SA}$ ).

Na imobilização foi oferecido 1558 mg de enzima, o que corresponde a 16,11 mg de enzima por g de suporte ativado seco. No final da imobilização, a filtração do meio reacional resultou em 162,6586 g de enzima imobilizada (EI), com uma umidade de 41%, correspondendo portanto a 95,9686 g de EI seca. O filtrado ( $V_1$ ) foi coletado e determinou-se o teor de proteína presente pelo método colorimétrico de Bradford. A enzima imobilizada foi lavada repetidamente com água destilada ( $V_2$ ), com tampão tris-HCl pH 7, 50 mM ( $V_2'$ ) e finalmente com o mesmo tampão, contendo 0,1% de benzoato

de sódio ( $V_3$ ), para a sua estocagem. A massa final de EI obtida foi de 94,8736 g, expresso em peso seco.

A curva padrão de dosagem de proteína pelo método de Bradford (equação 4.6) permite determinar a concentração de proteína das soluções enzimáticas antes e após a imobilização. Assim, é possível calcular o rendimento de fixação e a quantidade de proteína fixada por g de suporte. Na tabela 4.18 apresenta-se os volumes das soluções enzimáticas após a imobilização (filtrados), bem como o resultado da dosagem de proteína dessas soluções.

Tabela 4.18 - Dosagem de proteína das soluções enzimáticas após a imobilização

Filtrado	Volume (mL)	Teor de Proteína (mg/mL)	Total de proteína (mg)
$V_1$	900	0,88360	795,24
$V_2$	806	0,29125	234,75
$V_2'$	1224	0,04720	57,77
$V_3$	460	0,04147	19,08
$\Sigma$			1106,84

Sabendo-se que foi oferecido para a imobilização 1558 mg de enzima e que 1106,84 mg não foi fixado, determinou-se que 451,16 mg de enzima foi ligada ao suporte ativado seco (96,7306 g), produzindo-se assim uma enzima imobilizada com 4,66 mg de CGTase por g de suporte seco, o que corresponde a um rendimento de fixação de 28,96%. MORAES et al. (1990), utilizando a mesma enzima e o mesmo suporte, imobilizaram, pelo método da ligação covalente, 10,74 mg de proteína por g de suporte, com um rendimento de fixação de 30%. No entanto, a solução enzimática utilizada por eles não estava purificada e, outras proteínas menores preferencialmente se ligaram ao suporte, por se difundirem mais rapidamente na solução, o que pode ser constatado pela porcentagem de atividade imobilizada (9,0), que foi muito inferior à quantidade de proteína fixada. Neste trabalho, a porcentagem de atividade imobilizada foi de 28,68% (tabela 4.24), muito semelhante ao rendimento de fixação de proteína, fato esse que pode comprovar a pureza da CGTase purificada por cromatografia de afinidade bioespecífica.

Como pode ser observado na tabela 2.10 a maior fixação de proteína é relatada por CRUMP & ROZZEL (1988), que obtiveram uma EI com 30-50 mg de proteína por g de suporte, utilizando o mesmo método de ligação.

#### 4.7.1 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DOS FILTRADOS DA IMOBILIZAÇÃO

A atividade, quanto à formação de  $\beta$ -CD, das soluções enzimáticas dos filtrados obtidos após a imobilização, foi determinada conforme metodologia descrita no item 3.2.6.1. A dosagem da  $\beta$ -CD pela fenoltaleína permite calcular a concentração das amostras obtidas pela aplicação do processo de dosagem da atividade da enzima livre, sendo com isso possível traçar curvas de produção de  $\beta$ -CD para as diferentes soluções após a imobilização, possibilitando-se assim o cálculo da atividade total ou a porcentagem de atividade imobilizada, bem como a atividade máxima teórica da enzima imobilizada.

A figura 4.17 mostra as curvas de progresso de reação de formação de  $\beta$ -CD em função do tempo de reação. As amostras de cada tempo de reação foram dosadas pelo método colorimétrico da fenoltaleína, descrito no item 3.2.1.1 e as concentrações de  $\beta$ -CD foram calculadas utilizando-se o programa 1, listado no anexo 3.

Os resultados experimentais foram ajustados por regressão linear, e a partir dos coeficientes angulares das retas obtidas e das equações 3.6 e 3.7, determinou-se as atividades e as atividades específicas de cada filtrado. A tabela 4.19 mostra as equações obtidas e a tabela 4.20 os resultados das atividades.

Tabela 4.19 - Equações de ajuste dos resultados apresentados na figura 4.17

Filtrado	Equação	r
V <sub>1</sub>	$C_{\beta\text{-CD}} = 0,00924 t + 0,00733$	0,9982
V <sub>2</sub>	$C_{\beta\text{-CD}} = 0,00896 t + 0,01150$	0,9965
V <sub>2'</sub>	$C_{\beta\text{-CD}} = 0,00868 t + 0,00889$	0,9965
V <sub>3</sub>	$C_{\beta\text{-CD}} = 0,00888 t + 0,00821$	0,9971

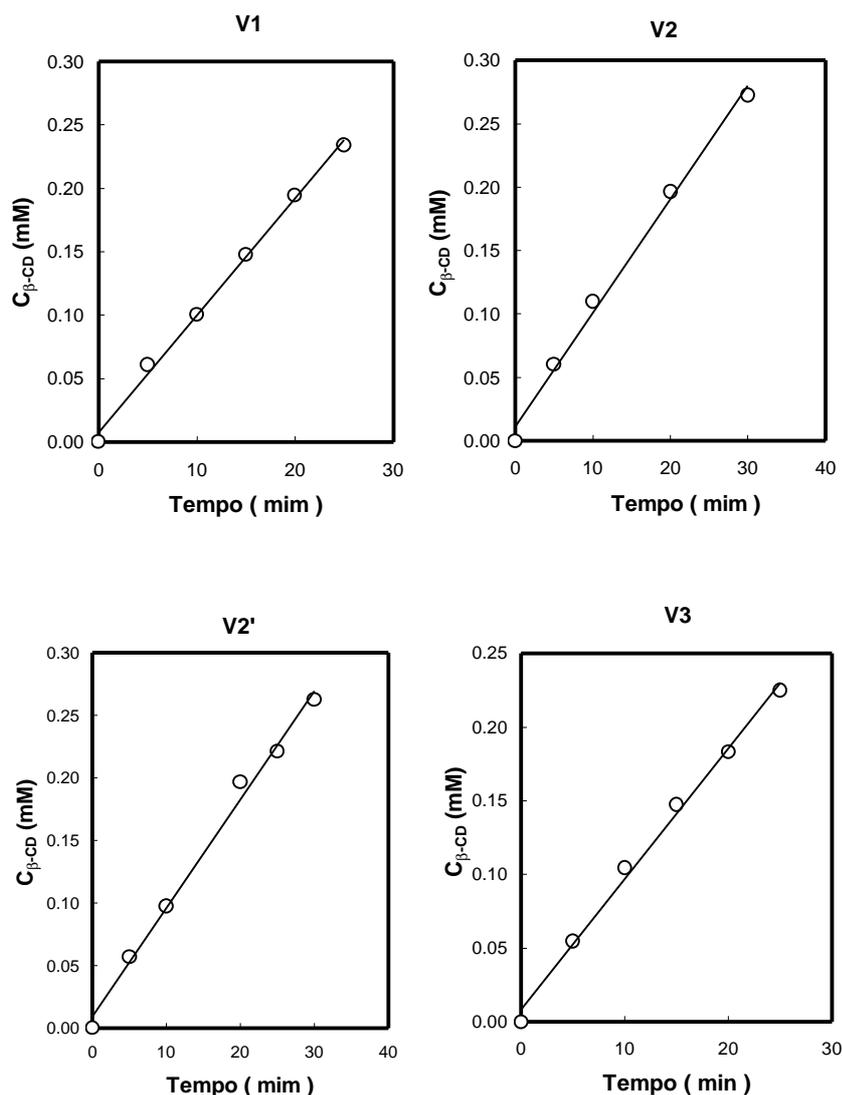


Figura 4.17 - Curvas de progresso da reação de formação de  $\beta$ -CD em função do tempo de reação, utilizando-se os filtrados da imobilização ( $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_2'$  e  $V_3$ ).

Tabela 4.20 - Atividade ( $A$ ) e atividade específica ( $A_e$ ) das soluções enzimáticas após a imobilização

Filtrado	$C_P$ (mg/mL)	Diluição	Coef. Angular	$A$	$A_e$
$V_1$	0,88360	1:3570	0,00924	65,97	74,66
$V_2$	0,29125	1:1190	0,00896	21,32	73,22
$V_2'$	0,04720	1:192	0,00868	3,33	70,62
$V_3$	0,04147	1:169	0,00888	3,00	72,38

Na tabela 4.20, a atividade é expressa em Unidades/mL de solução estoque, a atividade específica expressa em Unidades/mg de proteína e o coeficiente angular expresso em  $\mu\text{moles de } \beta\text{-CD} / (\text{min} \times \text{mL solução enzimática no ensaio})$ . Como pode ser observado, as atividades específicas para os filtrados da imobilização estão de acordo com a atividade específica obtida para a enzima purificada em solução, ou seja, 73,80 Unidades/mg de proteína.

#### 4.7.1.1 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TOTAL IMOBILIZADA E DA ATIVIDADE MÁXIMA TEÓRICA DA ENZIMA IMOBILIZADA

A atividade total das soluções enzimáticas antes e após a imobilização é determinada pela equação 4.12, ou seja:

$$A_T = A \times V \quad (4.12)$$

onde:

$A$  = atividade enzimática expressa em Unidades/mL solução enzimática

$A_T$  = atividade total expressa em Unidades

$V$  = volume da solução enzimática expresso em mL

A atividade imobilizada e a atividade máxima teórica da enzima imobilizada são calculadas pelas equações 4.13 e 4.14.

$$A_i = (A_{Ta} - A_{Tf}) \quad (4.13)$$

$$A_{mt} = A_i / M_{SA} \quad (4.14)$$

onde:

$A_i$  = atividade total imobilizada, expressa em Unidades

$A_{mt}$  = atividade máxima teórica da EI, expressa em Unidades/g<sub>EI</sub>

$A_{Ta}$  = atividade total antes da imobilização, expressa em Unidades

$A_{Tf}$  = atividade total após a imobilização, expressa em Unidades

$M_{SA}$  = massa de suporte ativado seco, expresso em g

Utilizando-se a equação 4.12 obteve-se as atividades totais mostradas na tabela 4.21, antes e após a imobilização.

Tabela 4.21 - Atividade total ( $A_T$ ) das soluções enzimáticas, antes e após a imobilização

Solução enzimática	A (Unidades/mL)	V (mL)	$A_T$ (Unidades)
Estoque	121,04	950	114988
$V_1$	65,97	900	59373
$V_2$	21,32	806	17184
$V_2'$	3,33	1224	4076
$V_3$	3,00	460	1380

A substituição dos resultados apresentados na tabela 4.21 na equação 4.13 fornece uma atividade imobilizada ( $A_i$ ) igual a 32975 Unidades, ou seja, 28,68% de atividade fixada. Com a equação 4.14 verifica-se que a atividade máxima teórica da EI é igual a 340,90 U/g<sub>EI</sub>.

Com base nos resultados apresentados na tabela 2.10, verifica-se que o método de imobilização utilizado foi eficiente quanto à fixação da atividade, uma vez que os valores obtidos por outros pesquisadores estão em torno de 25% de fixação da atividade.

#### 4.7.2 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CGT ase IMOBILIZADA (ICGT ase)

A atividade da CGTase imobilizada em sílica de porosidade controlada pelo método da ligação covalente foi determinada segundo a metodologia descrita no item 3.1.6.2. As atividades foram determinadas a 50°C, para os pHs 7 e 8, utilizando-se como substrato soluções de dextrina nas concentrações de 5 g/L e 100 g/L. Foram medidas as atividades em relação à produção de  $\beta$ -CD e de  $\gamma$ -CD.

As concentrações das diferentes amostras obtidas a partir do processo de dosagem da atividade da enzima imobilizada é calculada, no caso da  $\beta$ -CD, pelo método de dosagem colorimétrico da fenolftaleína (item 3.2.1.1), utilizando-se o programa 1, listado no anexo 3, e no caso da  $\gamma$ -CD, pelo método de dosagem colorimétrico do verde de bromocresol (item 3.2.1.2), utilizando-se a equação 4.4. É possível portanto, traçar curvas de produção de ciclodextrinas ( $\beta$  e  $\gamma$ -CD) em função do tempo de reação, para ambos os pHs e ambas concentrações de substrato, calculando-se assim a atividade da ICGTase e o rendimento em atividade da enzima imobilizada.

As figuras de 4.18 a 4.25 mostram as curvas de progresso da reação de formação das ciclodextrinas em função do tempo de reação.

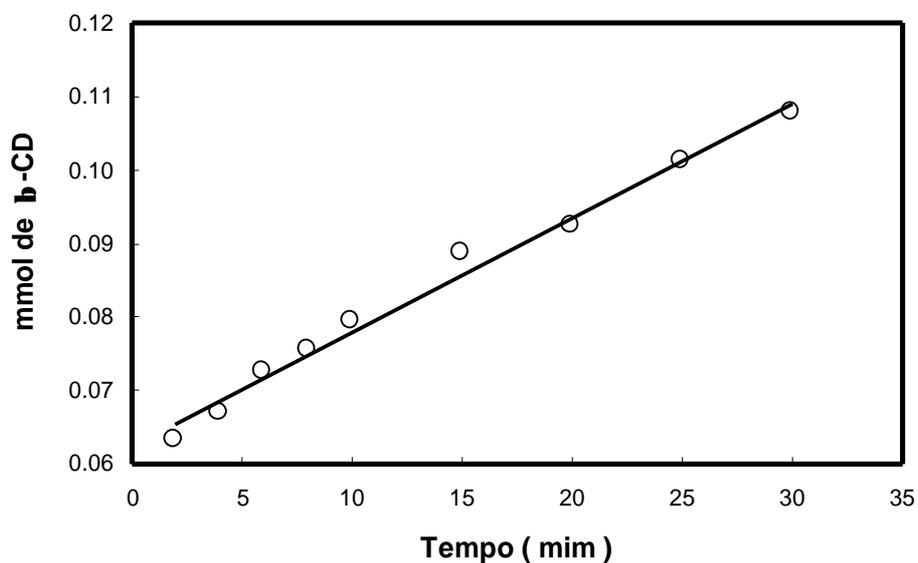


Figura 4.18 - Formação de  $\beta$ -CD em função do tempo de reação, catalisada pela enzima imobilizada (50°C, pH 7, substrato: dextrina 5 g/L).

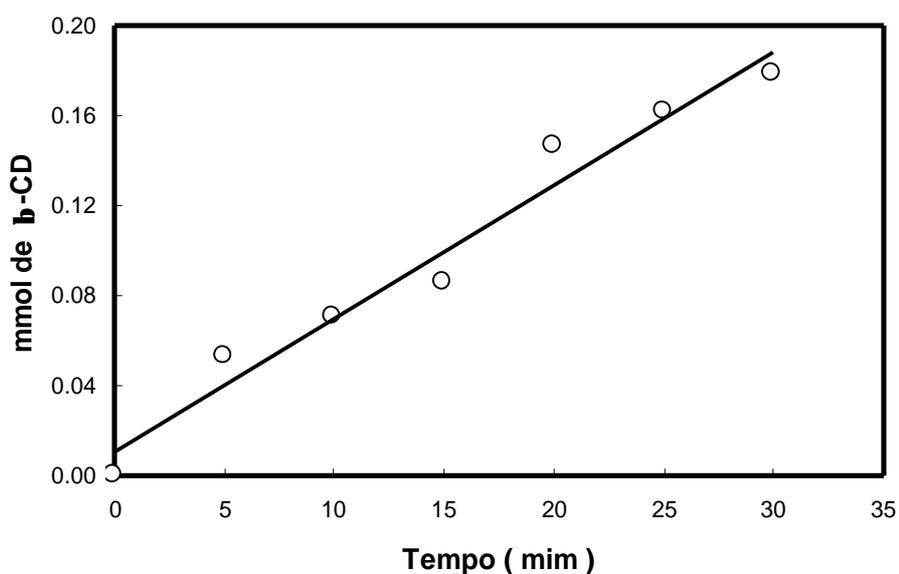


Figura 4.19 - Formação de  $\beta$ -CD em função do tempo de reação, catalisada pela enzima imobilizada (50°C, pH 7, substrato: dextrina 100 g/L).

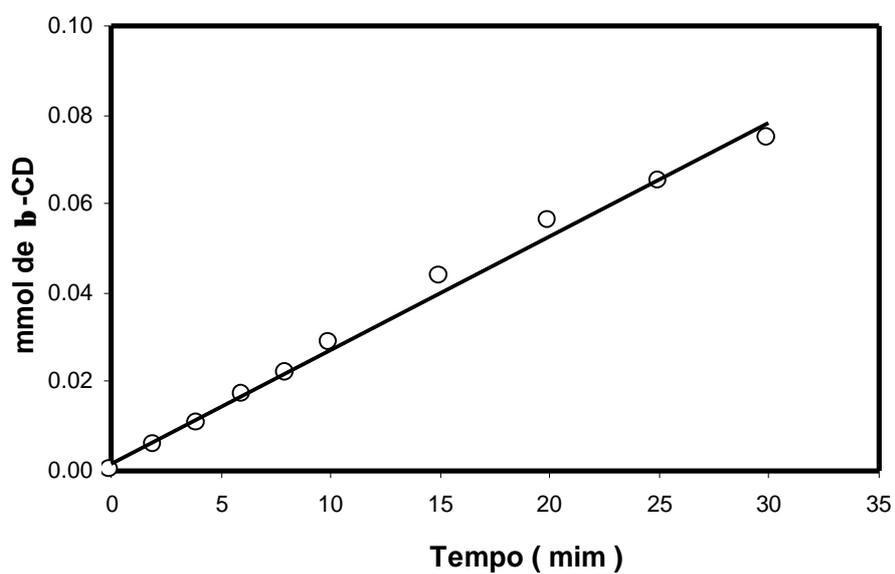


Figura 4.20 - Formação de  $\beta$ -CD em função do tempo de reação, catalisada pela enzima imobilizada (50°C, pH 8, substrato: dextrina 5 g/L).

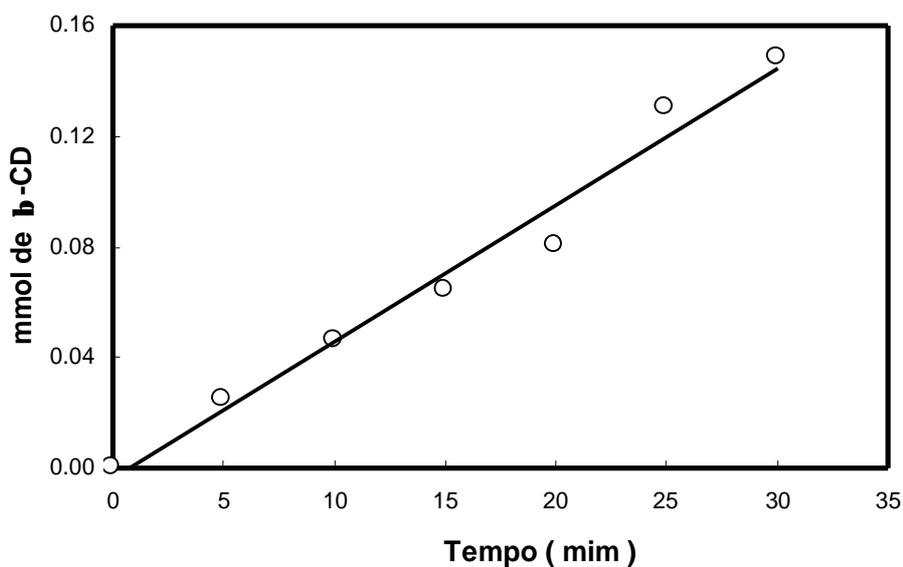


Figura 4.21 - Formação de  $\beta$ -CD em função do tempo de reação, catalisada pela enzima imobilizada (50°C, pH 8, substrato: dextrina 100 g/L).

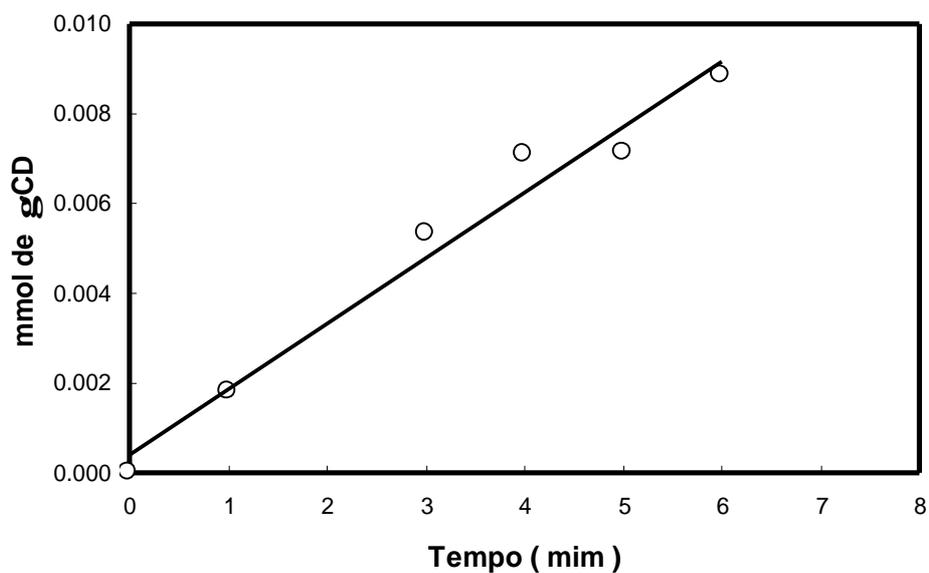


Figura 4.22 - Formação de  $\gamma$ -CD em função do tempo de reação, catalisada pela enzima imobilizada (50°C, pH 7, substrato: dextrina 5 g/L).

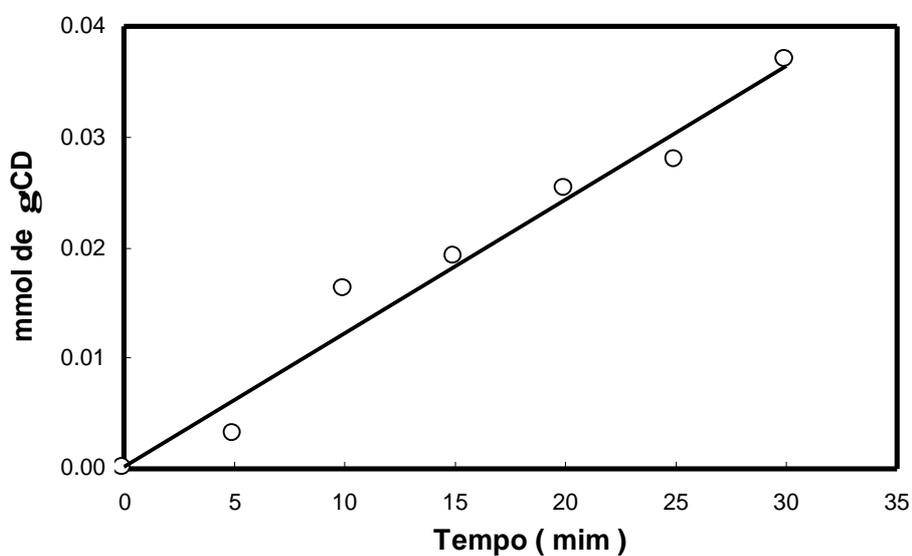


Figura 4.23 - Formação de  $\gamma$ -CD em função do tempo de reação, catalisada pela enzima imobilizada (50°C, pH 7, substrato: dextrina 100 g/L).

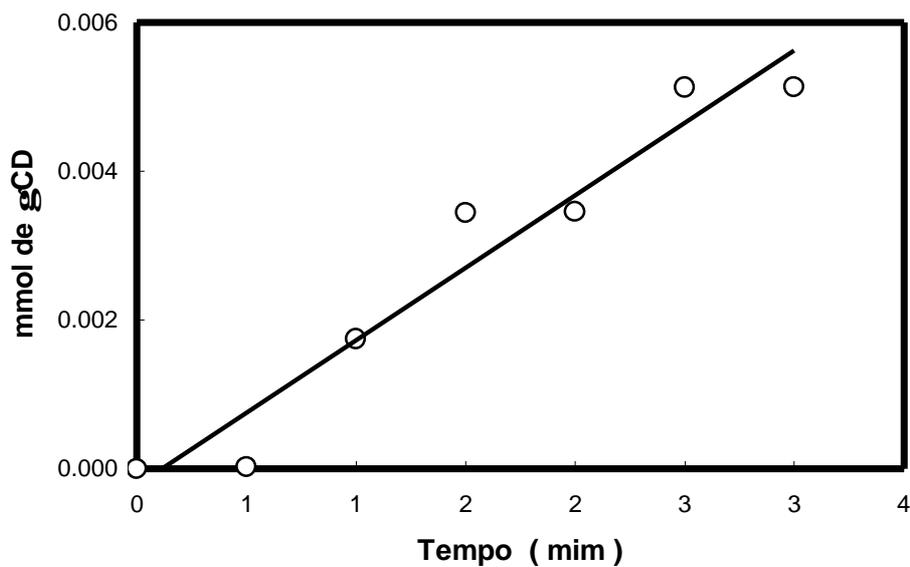


Figura 4.24 - Formação de  $\gamma$ -CD em função do tempo de reação, catalisada pela enzima imobilizada (50°C, pH 8, substrato: dextrina 5 g/L).

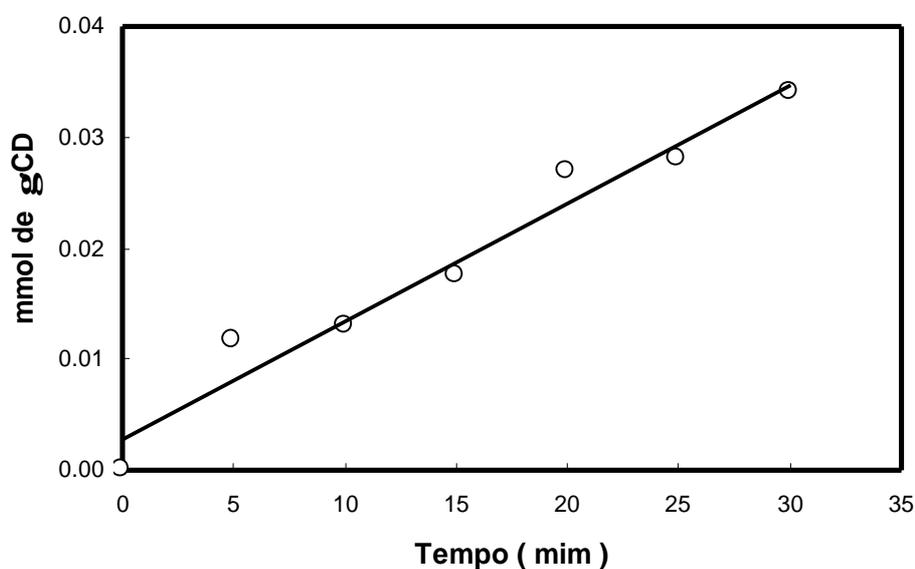


Figura 4.25 - Formação de  $\gamma$ -CD em função do tempo de reação, catalisada pela enzima imobilizada (50°C, pH 8, substrato: dextrina 100 g/L).

Os resultados de mmol de CD em função do tempo de reação foram ajustados por regressão linear, e as retas obtidas são mostradas na tabela 4.22.

Tabela 4.22 - Ajuste dos resultados de produção de CD em função do tempo de reação; nas equações de ajuste, y refere-se a mmol de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD e t ao tempo de reação em minutos

Condições da reação	Equações de ajuste para a $\beta$ -CD	Equações de ajuste para a $\gamma$ -CD
pH 7; dextrina 5 g/L	$y = 0,00156 t + 0,0622$ ( $r = 0,9937$ )	$y = 0,00146 t + 0,0004$ ( $r = 0,9866$ )
pH 7; dextrina 100 g/L	$y = 0,00592 t + 0,0106$ ( $r = 0,9830$ )	$y = 0,00121 t + 0,0002$ ( $r = 0,9921$ )
pH 8; dextrina 5 g/L	$y = 0,00256 t + 0,0015$ ( $r = 0,9964$ )	$y = 0,00195 t + 0,0002$ ( $r = 0,9705$ )
pH 8; dextrina 100 g/L	$y = 0,00494 t + 0,0036$ ( $r = 0,9884$ )	$y = 0,00106 t + 0,0028$ ( $r = 0,9802$ )

Utilizando-se os coeficientes angulares das retas mostradas na tabela 4.22 e as equações 3.8 e 3.9, determinou-se a atividade enzimática e a atividade específica para a CGTase imobilizada, quanto à formação de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD. Para os resultados mostrados na tabela 4.23, o teor de proteína da EI ( $P_{EI}$ ), utilizado na equação 3.9, foi de 4,66 mg de proteína/g<sub>EI</sub>; a massa de EI utilizada nos testes (expressa em base seca) foi de 0,2970 g em todas as determinações da atividade da ICGTase quanto à produção de  $\beta$ -CD e, para as determinações da atividade da ICGTase quanto à produção de  $\gamma$ -CD utilizou-se para a concentração de dextrina 100 g/L, 0,2970 g de EI para os pH 7 e 8 e, para a concentração de dextrina 5 g/L, utilizou-se 0,2942 g de EI para o pH 7 e 0,2903 g de EI para o pH 8.

Tabela 4.23 - Atividades da ICGTase quanto à produção de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD (50°C). A atividade da ICGTase ( $A_{EI}$ ) é expressa em  $\mu$ moles de CD/(min x g<sub>EI</sub>) e a atividade específica ( $A_{eEI}$ ) é expressa em  $\mu$ moles de CD/(min x mg de proteína)

	$\beta$ -CD				$\gamma$ -CD			
	CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE DEXTRINA							
	5 g/L		100 g/L		5 g/L		100 g/L	
pH	$A_{EI}$	$A_{eEI}$	$A_{EI}$	$A_{eEI}$	$A_{EI}$	$A_{eEI}$	$A_{EI}$	$A_{eEI}$
7	5,25	1,13	19,93	4,28	4,96	1,06	4,07	0,87
8	8,62	1,85	16,63	3,57	6,72	1,44	3,57	0,77

Observa-se na tabela 4.23 que a atividade enzimática da CGTase imobilizada é maior no pH 7, para a concentração de 100 g/L. HAMON & MORAES (1990), também obtiveram maior atividade enzimática da CGTase no pH 7, no entanto, utilizaram a enzima em solução, tendo como substrato 5 g/L de dextrina. Para a concentração de dextrina 5 g/L, observamos uma maior atividade no pH 8, como verificado também por MORAES et al. (1990), que determinaram a atividade da CGTase imobilizada nos pHs 6 e 8 (50°C, substrato: dextrina 5 g/L), obtendo para o pH 8 uma maior atividade (8,0 Unidades/mg). Esta atividade é aproximadamente 4 vezes superior à obtida neste trabalho (1,85 Unidades/mg).

Para os dois pHs (7 e 8), a maior atividade da CGTase imobilizada em relação à formação de  $\beta$ -CD, foi obtida utilizando-se como substrato dextrina 100 g/L. HAMON & MORAES (1990), para a CGTase em solução, obtiveram para o pH 8 uma maior atividade de formação de  $\beta$ -CD (determinada a 50°C) utilizando como substrato dextrina 5 g/L (100,5 Unidades/mg), ao invés de dextrina 100 g/L (29,9 Unidades/mg). A atividade da CGTase em solução, determinada neste trabalho, era de 63,1 Unidades/mg, aproximadamente 1,6 vezes menor à obtida por HAMON & MORAES (1990). No entanto, a CGTase fornecida pela WACKER, utilizada por estes autores, estava na forma líquida, enquanto a utilizada neste trabalho estava na forma liofilizada.

Na tabela 4.24 resume-se os resultados das atividades para as diferentes etapas da imobilização da CGTase, apresentando-se também o rendimento em atividade da imobilização, calculado a partir da relação entre a atividade obtida experimentalmente (tabela 4.23) e a atividade máxima teórica (item 4.7.1.1), ambas ensaiadas a 50°C, pH 8 e utilizando-se como substrato dextrina 5 g/L.

Tabela 4.24 - Atividade total da solução enzimática antes e após a imobilização, atividade da enzima imobilizada e rendimento em atividade.

Solução Enzimática			Enzima Imobilizada		
Atividade Total ( $\mu$ moles $\beta$ -CD/min)			Atividade máxima teórica (Unidades/g <sub>EI</sub> )	Atividade Experimental (Unidades/g <sub>EI</sub> )	Rendimento de Atividade (%)
Antes da Imobilização	Após a Imobilização	Atividade Imobilizada (%)			
114988	82013	28,68	340,90	8,62	2,53

MORAES et al. (1990) obtiveram um rendimento em atividade igual a 27,8% e uma atividade enzimática de 85,7 Unidades/g<sub>EI</sub>, utilizando o mesmo método de imobilização, a mesma enzima e o mesmo suporte. Como a preparação enzimática não estava purificada, a atividade específica sofreu uma redução de aproximadamente 10 vezes (8 Unidades/mg de proteína). Neste trabalho, a redução foi de aproximadamente 5 vezes, pois, embora a quantidade de proteína fixada tenha sido aproximadamente 2 vezes inferior à fixada nos trabalhos de MORAES et al (10,64 mg de proteína/g<sub>EI</sub>), esta quantidade correspondia exclusivamente à enzima CGTase. CATRY (1990) relata rendimentos bem superiores obtidos por outros pesquisadores, como por exemplo, KATO & HORIKOSHI (1984), que obtiveram um rendimento em atividade de 82,4%, imobilizando uma CGTase em DIAION HP-20 por ligação iônica.

STEIGHARDT & KLEINE (1993) e NAKAMURA & HORIKOSHI (1977) obtiveram 25% de atividade imobilizada, utilizando respectivamente o método da ligação covalente em vidro de porosidade controlada e adsorção em copolímero de vinilpiridina, o que está muito próximo ao obtido neste trabalho.

A figura 4.26 ilustra as curvas de progresso da reação de formação de  $\beta$ -CD obtidas nos testes de atividade com a enzima CGTase antes e após a purificação, e após a imobilização. Os testes foram conduzidos a 50°C, pH 8, utilizando-se como substrato uma solução de dextrina 5 g/L. As atividades específicas obtidas foram:

ANTES DA PURIFICAÇÃO:  $A_e = 63,10 \mu\text{moles } \beta\text{-CD}/\text{min mg}_{\text{proteína}}$

APÓS A PURIFICAÇÃO:  $A_e = 73,80 \mu\text{moles } \beta\text{-CD}/\text{min mg}_{\text{proteína}}$

APÓS A IMOBILIZAÇÃO:  $A_{eEI} = 1,85 \mu\text{moles } \beta\text{-CD}/\text{min mg}_{\text{proteína}}$

Observa-se uma redução de aproximadamente 40 vezes na atividade específica após a imobilização. Esta baixa recuperação da atividade enzimática, já observada para outras enzimas, poderia estar relacionada aos seguintes fatores:

- Impedimentos estéricos tais como, o sítio ativo da enzima não estar acessível ao substrato e/ou a enzima ser imobilizada por grupamentos funcionais pertencentes ao sítio ativo.
- Resistência difusional no interior dos poros do biocatalisador.
- A solução enzimática continha tampão tris-HCl, e os grupamentos NH<sub>2</sub> do tris-hidroximetil-aminometano poderiam competir com a CGTase na ligação ao suporte, no entanto, a quantidade de enzima fixada foi alta, a qual conduziria a uma atividade enzimática de 340,90 Unidades/g<sub>EI</sub>, se toda essa enzima permanecesse ativa.

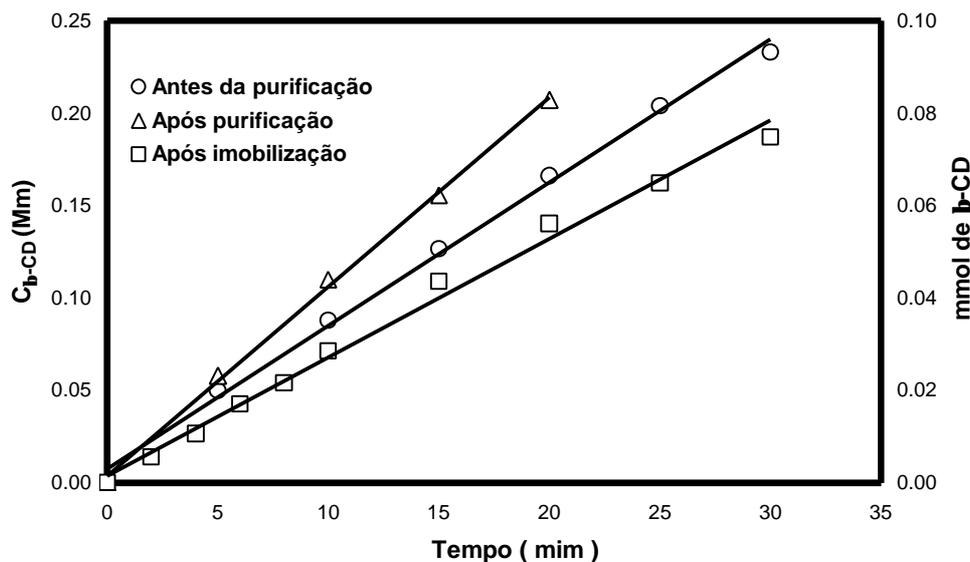


Figura 4.26 - Curvas de progresso da reação de formação de  $\beta$ -CD, obtidas na determinação da atividade da CGTase estoque, purificada e imobilizada ( $50^{\circ}\text{C}$ , pH 8, substrato: dextrina 5 g/L).

- d) Uma outra possível causa para a redução da atividade após a imobilização, seria a presença de  $\beta$ -CD, utilizada para eluir a CGTase, na purificação por cromatografia de afinidade bioespecífica. Como a  $\beta$ -CD não foi separada da solução enzimática, esta poderia reduzir a atividade enzimática, como verificado por KIM et al. (1993), que observaram um decréscimo de 85% na atividade da CGTase, na presença de 10 g/L de  $\beta$ -CD, concentração essa utilizada na eluição da enzima. Porém, a dosagem da solução enzimática não detectou a presença de  $\beta$ -CD no meio, revelando que esta CD foi convertida em glicose e outros maltooligossacarídeos. A presença de glicose, foi constatada pela dosagem da solução enzimática pelo método de GOD-PAP. KITAHATA et al. (1978), verificaram que a glicose é um eficiente receptor na reação de transglicosilação intermolecular (acoplamento e desproporcionamento), que compete com a reação de ciclização, reduzindo-se assim a atividade da CGTase quanto à formação de  $\beta$ -CD.
- e) O espaçador utilizado (glutaraldeído) poderia não ser adequado a esse tipo de enzima, porém, MORAES et al. (1990), utilizando o mesmo espaçador, imobilizou a mesma CGTase obtendo uma atividade específica de 8  $\mu\text{moles}$  de  $\beta$ -CD/(min x mg de proteína), aproximadamente 4 vezes superior ao encontrado neste trabalho.

Nenhum desses fatores, conduziram a uma explicação satisfatória da elevada redução observada na atividade enzimática da CGTase após sua imobilização, necessitando-se a continuidade deste estudo para se encontrar as causas concretas da perda acentuada da atividade da CGTase imobilizada.

#### **4.8 - PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS EM REATOR DE LEITO FLUIDIZADO (RLF) COM A ENZIMA CGTase IMOBILIZADA (ICGTase)**

Objetivou-se neste ensaio determinar a conversão de uma solução de dextrina 100 g/L em ciclodextrinas ( $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD) em função do tempo de residência do substrato no leito catalítico de um reator de leito fluidizado (figura 3.2). Utilizou-se como biocatalisador a enzima ciclodextrina glicosiltransferase imobilizada (ICGTase), conduzindo a reação a 50°C e pH 8. Nas condições do ensaio, a ICGTase possuía uma atividade específica de 3,57  $\mu$ moles de  $\beta$ -CD/(min x mg proteína) e 0,77  $\mu$ moles de  $\gamma$ -CD/(min x mg proteína).

A metodologia utilizada na produção de ciclodextrinas em RLF com a ICGTase foi descrita no item 3.2.9. Adotando-se uma porosidade de leito expandido de aproximadamente 0,5, fixou-se a vazão do substrato em aproximadamente 7,5 mL/min, calculada pela equação 2.2 e 2.3, utilizando-se os parâmetros da fluidização mostrados na tabela 4.12. Na tabela 4.25 são mostradas as alturas do leito fixo e do leito expandido (altura média de três determinações,  $H_{\text{médio}}$ ) em função da massa de biocatalisador no reator. Como pode-se observar, a massa total de enzima imobilizada utilizada foi de 88,848 g (414,03 mg de proteína), correspondendo a 96 cm de leito expandido. A vazão média de substrato foi de 7,60 cm<sup>3</sup>/min e a porosidade média do leito foi de 0,513, calculada para cada massa de ICGTase pela equação 2.1.

As amostras coletadas no efluente do reator de leito fluidizado foram dosadas pelo método colorimétrico da fenolftaleína (item 3.2.1.1) e do verde de bromocresol (item 3.2.1.2). As concentrações de  $\beta$ -CD foram então calculadas pelo programa 2, listado no anexo 3 e as concentrações de  $\gamma$ -CD calculadas utilizando-se a equação 4.15, obtida conforme metodologia descrita no item 3.2.1.2

$$C_{\gamma\text{-CD}} = 9,0310 \text{ ABS} - 0,0531 \quad (r = 0,9984) \quad (4.15)$$

Tabela 4.25 - Alturas de leito fixo ( $H_0$ ) e fluidizado ( $H_{\text{médio}}$ ) em função da massa de enzima imobilizada ( $M_{\text{EI}}$ ) no reator

Corrida	$M_{\text{EI}}$ (g)	Vazão média (cm)	$H_0$ (cm)	$H_{\text{médio}}$ (cm)	$\varepsilon$
1	2,8349	7,48	2,90	3,60	0,577
2	5,6701	7,62	5,90	6,38	0,523
3	8,5052	7,58	8,90	9,73	0,531
4	11,3401	7,28	11,80	12,70	0,521
5	14,1747	7,48	14,60	15,95	0,523
6	17,0093	7,73	17,30	19,23	0,525
7	19,8440	7,62	20,30	22,30	0,522
8	22,6804	7,68	23,10	25,50	0,523
9	25,5153	7,43	25,70	28,35	0,518
10	28,3502	8,03	28,70	31,85	0,522
11	31,1848	7,22	31,60	34,08	0,509
12	34,0199	7,82	34,10	37,68	0,516
13	36,8557	7,73	37,00	40,55	0,512
14	39,6920	7,33	40,40	43,23	0,507
15	42,5270	7,58	43,30	46,63	0,510
16	45,3615	7,68	46,10	49,97	0,513
17	48,1975	7,43	48,50	52,30	0,505
18	51,0334	7,48	51,40	55,60	0,507
19	53,8698	7,05	53,80	57,83	0,503
20	56,7057	7,63	57,30	61,63	0,506
21	59,5410	7,57	59,80	64,67	0,506
22	62,3775	8,00	61,50	68,28	0,510
23	65,2130	7,92	64,50	71,43	0,510
24	68,0524	7,27	67,40	73,23	0,501
25	70,8874	7,58	70,50	76,68	0,504
26	73,7223	8,45	72,60	81,63	0,515
27	76,5604	7,62	75,90	83,25	0,506
28	88,8480	7,46	86,00	96,03	0,503

Os resultados de todas as dosagens para cada tempo de coleta, em função da massa de IGCTase no reator, bem como as concentrações médias de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD obtidas, são mostrados no anexo 4 (item 8.4).

Na tabela 4.27 mostram-se as concentrações médias de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD determinadas para cada carga enzimática no reator, bem como as conversões de dextrina em  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD em função do tempo de residência real do substrato no leito fluidizado ( $t_R = H_{\text{médio}} \varepsilon / u$ ). As conversões foram calculadas utilizando-se as equações 3.11, 3.12 e 3.13, onde a concentração inicial de dextrina, base seca, foi de 96,7 g/L.

As figuras 4.27 e 4.28 mostram, respectivamente, as concentrações médias de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD em função da carga enzimática no reator. A equação 4.16 foi ajustada aos resultados experimentais, sendo os valores das constantes  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  e  $C_4$ , obtidos para a  $\beta$ -CD e para a  $\gamma$ -CD, mostrados na tabela 4.26.

$$C_{CD} = C_1 + C_2 / [ 1 + ( M_{EI} / C_3 )^{C_4} ] \quad (4.16)$$

Tabela 4.26 - Valores das constantes da equação 4.16, para a  $\beta$ -CD e para a  $\gamma$ -CD

Constantes	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
$C_1$	0,02871	0,01505
$C_2$	10,93469	2,92612
$C_3$	4,03171	9,62614
$C_4$	-1,30049	-1,19802

Tabela 4.27 - Conversão de dextrina em ciclodextrinas ( $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD) em reator de leito fluidizado, em função da massa de enzima imobilizada. Vazão média de substrato igual a 7,60 cm<sup>3</sup>/min e porosidade média do leito de 0,513.

M <sub>Ei</sub> (g)	u(cm/min)	$\epsilon$	t <sub>R</sub> (min)	C <sub><math>\beta</math>-CD</sub> mM	C <sub><math>\gamma</math>-CD</sub> mM	X <sub>A<math>\beta</math></sub>	X <sub>A<math>\gamma</math></sub>	X <sub>A total</sub>
0,0000	0,00	0,00	0,00	0,0000	0,0000	0,00	0,00	0,00
2,8349	3,73	0,577	0,56	4,4651	0,6322	5,24	0,85	6,09
5,6701	3,80	0,523	0,88	6,3800	0,9618	7,49	1,29	8,78
8,5052	3,78	0,531	1,36	7,8983	1,3065	9,27	1,75	11,02
11,3401	3,63	0,521	1,82	8,6364	1,6953	10,14	2,27	12,41
14,1747	3,73	0,523	2,23	9,2574	1,8765	10,87	2,52	13,38
17,0093	3,86	0,525	2,62	9,8386	1,9126	11,55	2,57	14,11
19,8440	3,80	0,522	3,06	10,0303	2,0692	11,77	2,78	14,55
22,6804	3,83	0,523	3,48	9,1195	2,0932	10,70	2,81	13,51
25,5153	3,71	0,517	3,95	10,3688	2,2558	12,17	3,03	15,20
28,3502	4,01	0,522	4,15	10,3577	2,2949	12,16	3,08	15,24
31,1848	3,60	0,509	4,81	10,4304	2,4093	12,24	3,23	15,47
34,0199	3,90	0,515	4,97	10,9447	2,3672	12,85	3,18	16,02
36,8557	3,86	0,512	5,38	10,0813	2,4906	11,83	3,34	15,17
39,6920	3,66	0,507	5,99	10,3860	2,6652	12,19	3,58	15,77
42,5270	3,78	0,510	6,29	10,2071	2,6261	11,98	3,52	15,50
45,3615	3,83	0,513	6,68	10,4260	2,5749	12,24	3,45	15,69
48,1975	3,71	0,505	7,12	10,8111	2,4906	12,69	3,34	16,03
51,0334	3,73	0,507	7,55	10,2750	2,5243	12,06	3,39	15,45
53,8698	3,52	0,500	8,21	10,6413	2,5297	12,49	3,39	15,88
56,7057	3,81	0,506	8,19	10,2890	2,5508	12,08	3,42	15,50
59,5410	3,78	0,506	8,65	10,6284	2,5328	12,47	3,40	15,87
62,3775	3,99	0,510	8,71	10,6388	2,6772	12,49	3,59	16,08
65,2130	3,95	0,510	9,21	10,5957	2,6471	12,44	3,55	15,99
68,0524	3,63	0,501	10,11	10,7715	2,6712	12,64	3,58	16,23
70,8874	3,78	0,504	10,21	10,5646	2,8428	12,40	3,81	16,21
73,7223	4,22	0,515	9,97	10,4634	2,7194	12,28	3,65	15,93
76,5604	3,80	0,506	11,08	10,7733	2,7224	12,64	3,65	16,30
88,8480	3,74	0,504	12,92	11,2445	2,7506	13,20	3,69	16,89

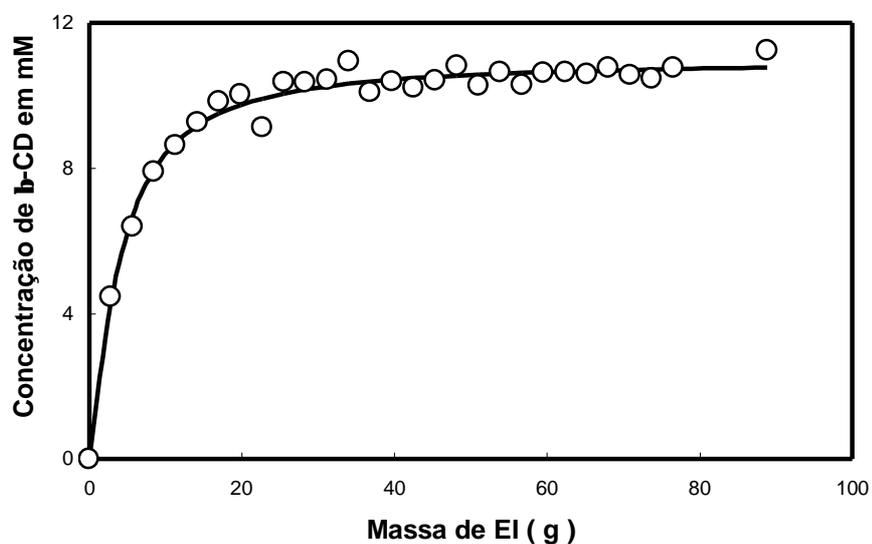


Figura 4.27 - Produção de  $\beta$ -CD em função da carga enzimática no reator de leito fluidizado, com a enzima CGTase imobilizada (50°C, pH 8, dextrina 100 g/L).

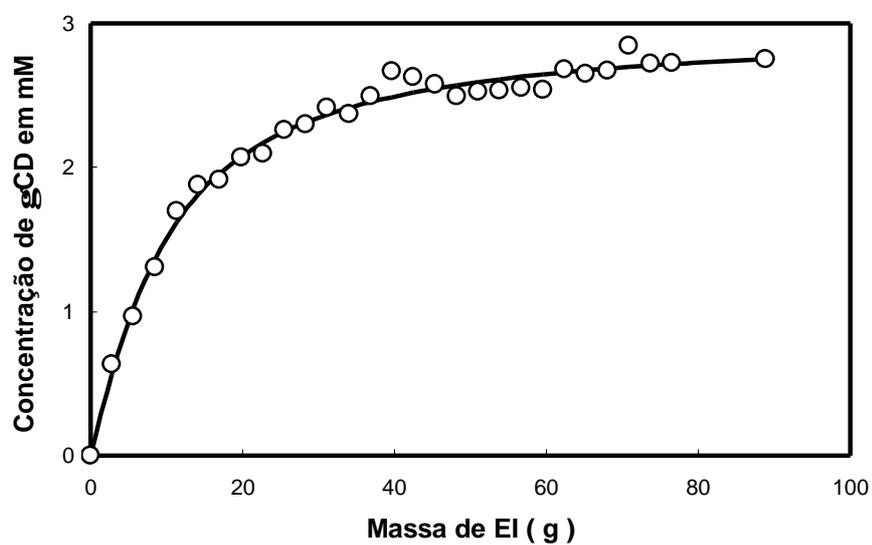


Figura 4.28 - Produção de  $\gamma$ -CD em função da carga enzimática no reator de leito fluidizado, com a enzima CGTase imobilizada (50°C, pH 8, dextrina 100 g/L).

A figura 4.29 compara a produção de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, em g/L, em função da carga enzimática no reator.

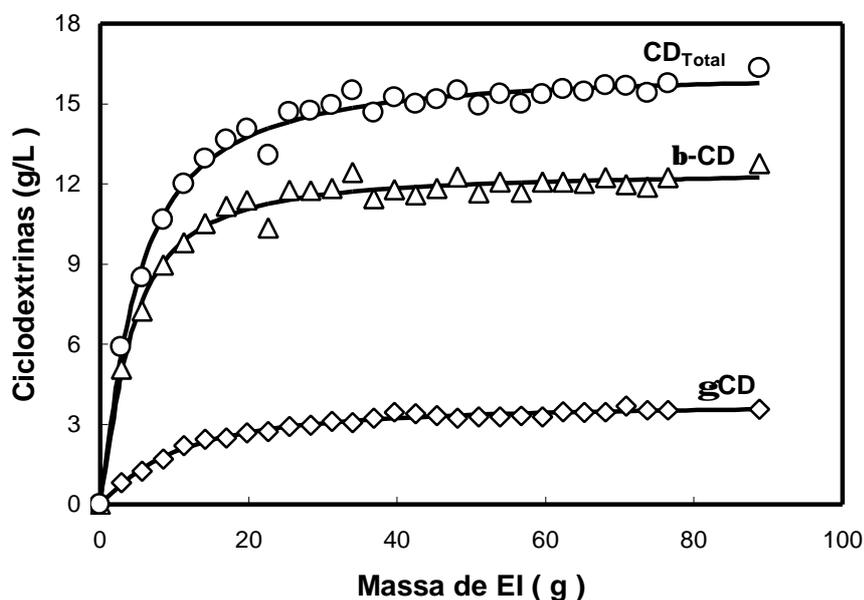


Figura 4.29 - Produção de ciclodextrinas, em g/L, em função da carga enzimática no reator de leito fluidizado (50°C, pH 8, dextrina 100 g/L).

A figura 4.30 mostra as conversões de dextrina em  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, bem como a conversão total, em função do tempo de residência real do substrato no leito fluidizado.

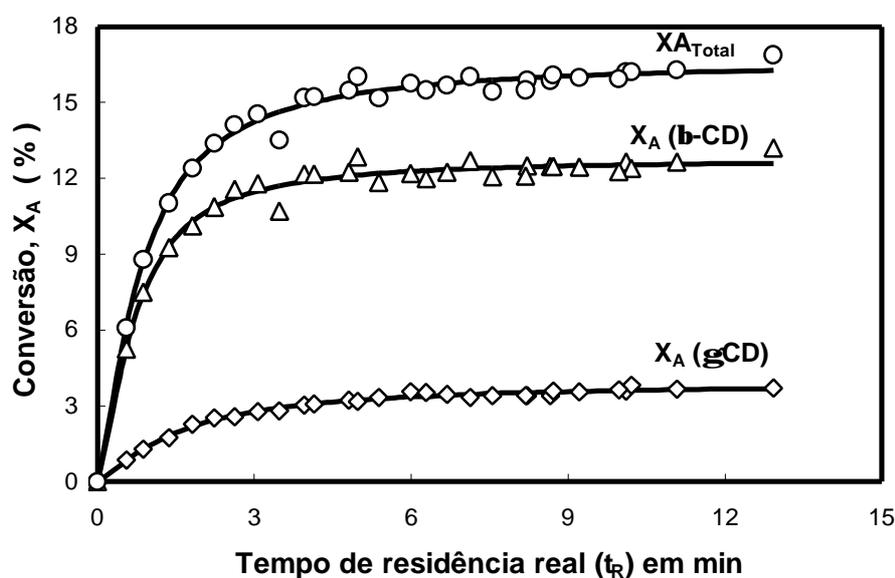


Figura 4.30 - Conversão de dextrina em CDs ( $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD) em reator de leito fluidizado, em função do tempo de residência real do substrato no leito catalítico (50°C, pH 8, dextrina 100 g/L).

Os parâmetros da equação 4.16, ajustada aos resultados mostrados na figura 4.29 e 4.30 são mostrados na tabela 4.28.

Tabela 4.28 - Valores das constantes da equação 4.16, ajustados aos dados apresentados nas figuras 4.29 e 4.30.

Constante	$\beta$ -CD		$\gamma$ -CD		CDs total	
	$X_A$	$C_{\beta\text{-CD}}$	$X_A$	$C_{\gamma\text{-CD}}$	$X_A$	$C_{\text{CDs}}$
$C_1$	12,7601	12,4434	3,9195	3,8151	16,6486	16,2471
$C_2$	-12,7622	-12,4109	-3,9189	-3,7954	-16,6576	-16,2042
$C_3$	0,7037	4,0316	1,5191	9,6269	0,8213	4,8521
$C_4$	1,5038	1,3005	1,2948	1,1981	1,3736	1,2120
$r$	0,9929	0,9924	0,9952	0,9947	0,9958	0,9953

Como pode ser observado na figura 4.30, a conversão máxima foi de aproximadamente 17%, para um tempo de residência de aproximadamente 13 minutos e uma carga enzimática de 414,03 mg de proteína imobilizada. A ICGTase produziu como produto principal o  $\beta$ -CD (11 mM) e em menor quantidade  $\gamma$ -CD (2,7 mM). A produção de  $\beta$ -CD foi aproximadamente 4 vezes superior à de  $\gamma$ -CD, o que mostra que essa enzima é uma  $\beta$ -CGTase. Como verificado por MORAES et al. (1990), a imobilização da CGTase aumenta a seletividade de produção de  $\beta$ -CD. Estes pesquisadores conseguiram uma seletividade de aproximadamente 89%, enquanto que para a enzima livre era de 78%. Neste trabalho obteve-se uma seletividade de produção de  $\beta$ -CD de aproximadamente 80%.

Como pode ser observado na tabela 4.27, com um tempo de residência de apenas 4 min (118,90 mg de proteína imobilizada), já é possível obter-se uma conversão total de 15% da dextrina em ciclodextrinas. Vários pesquisadores, relatados na tabela 2.10, obtiveram rendimentos bem superiores a esse (30 a 70%), no entanto, para a maioria, essas conversões necessitam de tempos de reação maiores (6 a 24 horas) ou exigem a utilização de soluções de substrato geralmente bem mais diluídas (1% ou mais).

YANG & SU (1989) e SU & YANG (1990) obtiveram uma conversão de 70%, utilizando uma suspensão de amido de batata 1%, numa operação contínua em reator tubular de 60 cm de comprimento por 2 cm de diâmetro, utilizando como biocatalisador a

CGTase ligada covalentemente em quitosana. As condições operacionais foram 55°C, pH 8,5 e uma velocidade espacial de 0,055 h<sup>-1</sup>. A conversão de amido de batata 5%, em reator tubular de 20 cm x 2 cm e a uma vazão de 3,0 mL/min, foi de 46%, a 50°C e pH 8,5.

STEIGHARDT & KLEINE (1993) utilizando a CGTase imobilizada em vidro poroso, pelo método da ligação covalente, com um teor de proteína de 3,5-4,0 mg de proteína/g<sub>EI</sub>, obtiveram um rendimento de 58%, no entanto, numa operação batelada de 24 horas e utilizando amido solúvel 2,5%.

CRUMP & ROZZELL (1988) obtiveram 50% de rendimento de CDs, a partir de uma solução de maltodextrina com DE igua a 5, numa operação contínua a 50°C, pH 7, utilizando-se como biocatalisador a CGTase ligada covalentemente em sílica, com um teor de proteína de 30-50 mg por g de enzima imobilizada. No entanto, estes pesquisadores não relatam a concentração da solução de maltodextrina, nem tampouco a vazão do substrato no leito catalítico.

MORAES et al. (1990) conseguiram uma conversão total de dextrina em CDs igual a 27,3%, com 8,37 mg da CGTase imobilizada em SPC e as mesmas condições de reação numa operação batelada (ver item 2.6). No entanto, o tempo requerido para essa conversão foi de 24 horas. Com 5 minutos de reação MORAES et al., conseguiram uma produção de 11,5 mM de β-CD (14% de conversão), semelhantemente ao obtido neste trabalho, no entanto, com uma quantidade de proteína no meio reacional 14 vezes menor à utilizada na operação contínua com o reator de leito fluidizado, uma vez que a CGTase imobilizada por estes pesquisadores resultou numa preparação muito mais ativa que neste trabalho, como já discutido na seção 4.7.2.

Com relação ao processamento batelada de 24 horas, com a CGTase livre, HAMON & MORAES (1990), obtiveram uma conversão de 14,6% (10 mM de β-CD), com uma carga enzimática de 1,16 mg de proteína. Essa mesma conversão pode ser conseguida no reator de leito fluidizado com a CGTase imobilizada, porém, com uma redução de 360 vezes no tempo de produção. No entanto, a carga enzimática requerida foi de aproximadamente 103 vezes superior à utilizada no processamento batelada com a CGTase livre, por ser esta 8 vezes mais ativa que a CGTase imobilizada neste trabalho. Com relação ao tempo de processamento, a utilização da CGTase imobilizada na produção de β-CD é muito mais vantajosa de que com a CGTase livre.

Comparando-se os resultados de MORAES et al. (1990) para a CGTase imobilizada, utilizada em reator batelada, observa-se que estes autores obtiveram a

mesma conversão em 5 minutos de reação. Porém a alternativa do reator de leito fluidizado é preferível, pois permite o processamento de forma contínua.

Tomando-se por base a seletividade e a quantidade de  $\beta$ -CD produzida em um intervalo de tempo extremamente curto, a utilização da CGTase na forma imobilizada e a produção de  $\beta$ -CD em reator de leito fluidizado é muito favorável para uso em escala industrial, pois este reator poderia conduzir à utilização de volumes reacionais menores, comparado com a utilização da enzima em solução, contribuindo para a obtenção de processos mais econômicos, onde a  $\beta$ -CD é produzida continuamente e com uma alta seletividade, facilitando-se assim os processos de separação.

## 5 – CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas com a realização deste trabalho são apresentadas a seguir, na seqüência em que apareceram no capítulo 4 (Resultados e Discussão).

1 – Na dosagem de  $\beta$ -CD pelo método colorimétrico da fenolftaleína, a  $\gamma$ -CD e a dextrina competem com o corante para a formação do complexo CD-hóspede. Isto induz à concentrações de  $\beta$ -CD que não refletem o valor real, sendo portanto necessária a utilização da teoria da complexação, para o cálculo da concentração real de  $\beta$ -CD (conforme procedimento descrito no anexo 8.2, utilizando os programas listados no anexo 8.3).

2 – Na dosagem de  $\gamma$ -CD pelo método colorimétrico do Verde de Bromocresol, as demais CDs e a dextrina não interferem significativamente. Portanto, é suficiente apenas descontar-se a concentração aparente de  $\gamma$ -CD medida no ponto zero, para a determinação da real concentração de  $\gamma$ -CD.

3 – Constatou-se que altas concentrações de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD interferem na dosagem colorimétrica de proteínas pelo método de Bradford, induzindo à concentrações aparentes de proteína. Para os limites de solubilidade da  $\beta$ -CD e da  $\gamma$ -CD, essas concentrações são, respectivamente, da ordem de 0,03 mg/mL e 0,08 mg/mL.

4 – A sílica de porosidade controlada, fornecida pela Sucrierie Vanciennes, foi satisfatoriamente caracterizada, apresentado um diâmetro médio de partículas (dp) igual a 0,42 mm, uma densidade cristalina ( $\rho_s$ ) de 2,1815 g/cm<sup>3</sup> e, porosidade interna ( $\epsilon_p$ ) e densidade da partícula seca ( $\rho_p$ ) de 0,574 e 0,930 g/cm<sup>3</sup>, respectivamente.

5 – O modelos teóricos utilizados na determinação da velocidade mínima de fluidização ( $u_{mf}$ ) e do coeficiente de expansão ( $n$ ) se ajustaram satisfatoriamente aos resultados experimentais (0,045 cm/s e 3,98, respectivamente), ajustados com a correlação de Richardson & Zaki (desvios de 13,3% e 1,5%, respectivamente). O cálculo da velocidade terminal das partículas ( $u_t$ ), usando correlações de Richardson & Zaki, apresentou um desvio muito alto (35,7%) em relação ao valor experimental (2,346 cm/s).

6 – A enzima ciclodextrina glicosiltransferase, originária do *Bacillus alcalofílico* sp., clonada em *E. coli*, fornecida pela WACKER na forma liofilizada, mostrou-se não homogênea quanto ao teor de proteínas, sendo o teor médio estimado em 193,1 mg de proteína por g de enzima liofilizada.

7 – A CGTase foi eficientemente purificada por cromatografia de afinidade bioespecífica, utilizando-se  $\beta$ -CD como ligante. A recuperação do total de proteínas aplicada foi de 94%. Em termos de atividade total, o rendimento foi de 72%, com um fator de purificação igual a 1,2.

8 – A CGTase purificada apresentou um aumento em atividade com relação à enzima liofilizada, o que pode ser observado claramente na figura 4.26, onde a inclinação da curva de progresso de reação para a enzima purificada é maior ao da não purificada. Enquanto a atividade específica da enzima liofilizada, medida a 50°C, pH 8, era de 63,10  $\mu$ moles  $\beta$ -CD/(min x mg), a atividade da enzima purificada aumentou para 73,80  $\mu$ moles  $\beta$ -CD/(min x mg). Quando comparadas as atividades em relação à produção de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, verifica-se que essa enzima produz preferencialmente  $\beta$ -CD, pois sua atividade em relação à produção de  $\beta$ -CD é aproximadamente 3 vezes superior àquela de  $\gamma$ -CD, tratando-se portanto de uma  $\beta$ -CGTase.

9 – No que se refere à imobilização, o método da ligação covalente, utilizando glutaraldeído como reagente bifuncional, conduziu a um rendimento de fixação de aproximadamente 29%. Com isso a enzima imobilizada apresentou 4,66 mg de proteína por g de suporte seco e uma atividade de 1,85  $\mu$ moles  $\beta$ -CD/(min x mg), medida a 50°C, pH 8 e utilizando-se como substrato uma solução de dextrina 5 g/L. No entanto, o rendimento em atividade foi de apenas 2,53%, o que representa um valor muito baixo em relação a atividade total imobilizada, que foi de aproximadamente 29%.

10 – A produção de CDs em reator de leito fluidizado, utilizando a CGTase imobilizada, apresentou resultados satisfatórios, como pode ser observado nas figuras 4.27, 4.28, 4.29 e 4.30. A produção máxima de  $\beta$ -CD foi de aproximadamente 11 mM, enquanto a produção máxima de  $\gamma$ -CD foi de aproximadamente 2,7 mM, o que representa uma seletividade quanto à produção de  $\beta$ -CD da ordem de 80%. Esta produção representa uma conversão total de dextrina em CDs ( $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD) ao redor de 17%, alcançada com um tempo de residência em torno de 13 minutos.

11 – A comparação das produções máximas de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD no reator de leito fluidizado, com àquelas apresentadas na literatura mostra que a utilização da enzima imobilizada é muito mais vantajosa do que a utilização da enzima em solução. Praticamente a mesma conversão total foi obtida no reator de leito fluidizado em apenas 4 minutos de operação, enquanto num processamento em batelada, o tempo necessário é de 24 horas.

## 6 – SUGESTÕES

1 – Verificar se as propriedades enzimáticas da CGTase purificada por cromatografia de afinidade bioespecífica (CAB) sofrem alteração em relação à enzima bruta, ou seja, estudar o comportamento da atividade enzimática em função do pH e da temperatura, encontrando as condições ótimas para a medida da atividade.

2 – Verificar a estabilidade da CGTase purificada quando ao pH e à temperatura.

3 – Estudar a imobilização da CGTase em suportes com diferentes diâmetros de partícula e diâmetro médio de poro, para verificar problemas de resistências difusionais.

4 – Testar outros suportes e outros métodos de imobilização da CGTase, como por exemplo, a imobilização em resina DIAION HP-20 por adsorção, com o qual KATO & HORIKOSHI (1984), obtiveram um rendimento em atividade de 82,4%.

5 – Testar o mesmo método de imobilização, ou seja, ligação covalente em sílica de porosidade controlada, após a eliminação da  $\beta$ -CD da solução enzimática, obtida da purificação da CGTase por CAB, com o objetivo de avaliar a influência desta CD na ligação da enzima ao suporte e na atividade da enzima imobilizada.

6 – Imobilizar a enzima na presença de tampão fosfato, pH 7, para se comparar com os resultados obtidos utilizando-se o o tampão tris-HCl, pH 8.

7 – Verificar a influência da co-imobilização da enzima desramificadora pullulanase com a CGTase purificada por CAB. Foi verificado por MORAES et al. (1990), que a pullulanase, além de aumentar o rendimento de CDs, auxilia na fixação de proteína e na imobilização da atividade total oferecida.

8 – Estudar a produção de CDs no reator de leito fluidizado, testando outros substratos, como por exemplo, o amido de milho, com o qual MATIOLI (1997) obteve uma produção de 19 mM de  $\beta$ -CD, numa operação batelada de 24 horas, com a enzima em solução. Além de testar novos substratos, poderia-se ainda estudar a produção de CDs, com o mesmo substrato utilizado, no entanto, na presença de etanol, que aumenta consideravelmente o rendimento de CDs, como verificado por exemplo por MATTSSON et al. (1991), que conseguiram aumentar o rendimento de  $\beta$ -CD de 19% para 46%, utilizando etanol numa concentração de 15% (v/v) e, por YANG & SU (1989), que obtiveram um acréscimo da ordem de 10% na produção de CDs, a partir de amido de batata 5%, utilizando 16% de etanol.

9 – Verificar ainda a influência da porosidade do leito fluidizado sobre a produção de CDs, utilizando como substrato a maltodextrina, com o objetivo de comparar com a porosidade nominal adotada neste trabalho que foi 0,5.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBRUSTER, F. C., 1988, "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**, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 33-39.
- ANTLSPERGER, G., REUSCHER, H. & SCHMID, G., 1996, "The Favourable Toxicological Proprieties of Gama-Cyclodextrin", **Wacker-Chemie GmbH**.
- ARMSTRONG, D. W., WARD, T. J., ARMSTRONG, R. D. & BEESLEY, T. E., 1986, "Separation of Drug Stereoisomers by the Formation of  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes", **Science**, v. 232, pp. 1132-1135.
- ARMSTRONG, D. W., 1988, "Cyclodextrin in Analytical Chemistry". In: HUBER, O. & SZEJTLI, J. (eds), **Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins**, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 437-450.
- BAR, R., 1996, "Applications of Cyclodextrins in Biotechnology". In: SZEJTLI, J. & OSA, T., (eds), **Comprehensive Supramolecular Chemistry**, First edition, chapter 13, New York, USA, Elsevier Science Ltd.
- BEKERS, O.; UIJTENDAAL, E. V.; BEIJNEN, J. H.; BULT, A. & UNDERBERG, W.J.M., 1991, "Cyclodextrins in the Pharmaceutical Field", **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 17, n. 11, pp.1503-1549.
- BENDER, H. 1981, "Enzymology of the Cyclodextrins" In: SZEJTLI, J. (ed.), **The First International Symposium on Cyclodextrins**, Publishing Company, pp. 77-88.
- BENES, E. & SZEJTLI, G., 1996, "Actual Trends in the Cyclodextrin Literature (Statistical Evaluation)". In: **The 8th International Cyclodextrin Symposium**, Budapest, Programme and Abstracts, pp. 1-27.
- BERGSMA, J., BRUINENBERG, P. M., HOKSE, H. & MEIBERG, J. B. M., 1988, "Cyclodextrins from Potato Starch Recent Developments". In: HUBER, O. & SZEJTLI, J. (eds), **Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins**, Kluwer Academic Publishers, pp. 41-46.

- BERNA, P., 1990, **Etude de la Purification et de l'interaction de la Cyclodextrine Glycosyl Transferase avec un Ligand Biospecifique et un Ligand Pseudobiospecifique**, L.T.S., Université de Technologie de Compiègne, France, 31 p.
- BERNA, P.; MORAES F. F. ; BARBOTIN, J. N.; THOMAS, D. & VIJAYALAKSHMI, M. A., 1996, "One-Step Affinity Purification of a Recombinant Cyclodextrin Glycosyl Transferase by (Cu(II), Zn(II) Tandem Column) Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography". In: **Advances in Molecular and Cell Biology**, v. 15B, JAI Press Inc., pp. 521-535.
- BRADFORD, M. M., 1976, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", **Analytical Biochemistry**, v.72, pp.248-254.
- CATRY, S., 1990, **Etude de L'Immobilisation de La CGTase WACKER**, Laboratoire de Technologie Enzymatique, Relatório Técnico, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France, 38 p.
- CITERNESI, U. & SCIACCHITANO, M., 1995, "Ciclodextrinas em dermocosméticos funcionais", **Cosmetics & Toiletries**, v. 7, pp. 50-55.
- CRUMP, S. P. & ROZZELL, J. D., 1988, "Production of Cyclodextrins using Immobilized Enzymes". In: HUBER, O. & SZEJTLI, J. (eds), **Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins**, Kluwer Academic Publishers, pp. 47-53.
- DUCHÊNE, D., 1987, **Cyclodextrin and Their Industrial Uses**. Paris, Edition de Santé.
- DUCHÊNE, D., GLOMOT, F. & VAUTION, C., 1987, "Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins". In: DUCHÊNE, D. (ed), **Cyclodextrins and their Industrial Uses**, Chapter 6, Paris, France, Editions de Santé.
- ENGLBRECHT, A., HARRER, G., LEBERT, M. & SCHMID, G., 1990, "Biochemical and Genetic Characterization of a CGTase from Alkalophilic Bacterium Forming Primarily  $\gamma$ -Cyclodextrin". In: DUCHÊNE, D. (ed), **Minutes of the Fifth International Symposium on Cyclodextrins**, Editions de Santé, Paris, pp. 25-31.

- FRÖMMING, K. H. & SZEJTLI, J., 1994, **Cyclodextrins in Pharmacy**, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 1-81.
- HAMOM, V. & MORAES, F. F., 1990, **Etude Preliminare a L'Immobilisation de L'Enzime CGTase WACKER**. Relatório de Pesquisa, Laboratoire de Technologie Enzymatique, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France, 234 p.
- HAUSLER, O. & MULLER-GOYMANN, C. C., 1993, "Properties and Structure of Aqueous Solutions of Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin", **Starch**, v. 45, n. 5, pp. 183-187.
- HISAMATSU M. & YAMADA, T., 1989, "Production of Maltosyl  $\beta$ -Cyclodextrin by a Bioreactor System with Pullulanase Immobilized on Partially Deacetylated Chitin", **Starch**, v. 41, n. 6, pp. 239-242.
- HORIKOSHI, K., 1979, "Production and Industrial Applications of  $\beta$ -Cyclodextrin", **Process Biochemistry**, v. 14 (May), pp. 26-30.
- HORIKOSHI, K., 1988, "Enzymology and Molecular Genetics of CD-Forming Enzymes". In: HUBER, O. & SZEJTLI (eds), **Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins**, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 7-17.
- KANEKO, T., KUDO, T. & HORIKOSHI, K., 1990, "Comparison of CD Composition Produced by Chimeric CGTases", **Agricultural Biological Chemistry**, v. 54, n. 1, pp. 197-201.
- KATO, T. & HORIKOSHI, D., 1984, "Colorimetric Determination of  $\gamma$ -Cyclodextrin", **Analytical Chemistry**, v. 56, pp. 1738-1740.
- KATO, T. & HORIKOSHI, K., 1986, "Cloning and Expression of the *Bacillus subtilis* No.313  $\gamma$ -Cyclodextrin Forming CGTase Gene in *Escherichia coli*", **Agricultural Biological Chemistry**, v. 50, n. 8, pp. 2161-2162.

- KENNEDY, J. F. & WHITE, C. A., 1985, "Principles of immobilization of Enzymes". In: WISEMAN, A. (ed), **Handbook of Enzyme Biotechnology**, 2nd ed., Chichester, John Wiley & Sons.
- KIM, T. J., LEE, Y. D. & KIM, H. S., 1993, "Enzymatic Production of Cyclodextrins from Milled Corn Starch in an Ultrafiltration Membrane Bioreactor", **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, pp. 88-94.
- KITAHATA, S., OKADA, S. & FUKUI, T., 1978, "Acceptor Specificity of the Transglycosylation Catalyzed by Cyclodextrin Glycosyltransferase", **Agricultural Biological Chemistry**, v. 42, n. 12, pp. 2369-2374.
- KOROLKOVAS, A., 1991, "Inclusão Molecular e Ciclodextrinas: Propriedades e Aplicações Terapêuticas", **ENLACE Farmalab**, ANO 5, v. 2 (Fev), pp. 6-15.
- KUNII, D. & LEVENSPIEL, O., 1969, **Fluidization Engineering**. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- LÁSZLÓ, E., BANKY, B., SERES, G. & SZEJTLI, J., 1981, "Purification of Cyclodextrin-Glycosyltransferase Enzyme by Affinity Chromatography", **Starch**, v. 33, n. 8, pp. 281-283.
- LEE, K. C. P. & TAO, B. Y., 1995, "A Kinetic Study of Cyclodextrin Glycosyltransferase: Substrate and Product Inhibitions", **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 21, pp. 111-121.
- LIMA, H. O. S., 1996, **Produção de  $\beta$ -ciclodextrina por fermentação e ciclização simultâneas**. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.
- LICHTENTHALER, F. W. & IMMEL, S., 1996, "The Lipophilicity Patterns of Cyclodextrins and of Non-glucose Cyclooligosaccharides". In: SZEJTLI, J. & SZENTE, L. (eds), **Proceedings of the Eighth International Symposium on Cyclodextrins**, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 3-16.

- MATIOLI, G., 1997, **Seleção de Microrganismo e Caracterização de sua Enzima Ciclodextrina Glicosiltransferase**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.
- MATTSSON, P., MÄKELA, M. & KORPELA, T., 1988, "Isolation and Purification of Gamma-Cyclodextrin by Affinity Chromatography". In: HUBER, O. & SZEJTLI, J. (eds), **Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins**, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 65-70.
- MATTSSON, P., KORPELA, T., PAAVILAINEN, S. & MÄKELA, M., 1991, "Enhanced Conversion of Starch to Cyclodextrins in Ethanolic Solutions by *Bacillus circulans* var *alkalophilus* cyclomaltodextrin glucanotransferase", **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, pp. 17-28.
- MORAES, F.F., 1990, **Produção de Ciclodextrinas**, Projeto de Pesquisa, DEQ, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, Brasil, 50 p.
- MORAES F. F., CATRY, S., DELBOURG, M. F. THOMAS, D. & BARBOTIN, J. N., 1990, "Production of Cyclodextrins with Immobilised CGTase and Co-Immobilised Pullulanase". In: MORAES, F.F., **Produção de Ciclodextrinas**, Projeto de Pesquisa, DEQ, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, Brasil, 50 p.
- MORI, S., HIROSE, S., OYA T. & KITAHATA, S., 1994, "Purification and Properties of Cyclodextrin Glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. No. 9605", **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 58, n. 11, pp. 1968-1972.
- MORI, S., GOTO, M., MASE, T., MATSUURA, A., OYA, T. & KITAHARA, S., 1995, "Reaction Conditions for the Production of  $\gamma$ -Cyclodextrin by Cyclodextrin Glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. No. 9605", **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 59, n. 6, pp.1012-1015.
- NAKAGAWA, T., UENO, K., FUJII, M., et al., 1996, "The Preparations of a Novel Cyclodextrin Homologue with D.P. Five, [5]CD". In: SZEJTLI, J. & SZENTE, L. (eds), **Proceedings of the Eighth International Symposium on Cyclodextrins**, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 67-70.

- NAKAMURA, N. & HORIKOSHI, K., 1976, "Characterization and Some Cultural Conditions of a Cyclodextrin Glycosyltransferase-producing Alkalophilic *Bacillus* sp.", **Agricultural Biological Chemistry**, v. 40, n. 4, pp. 753-757.
- NAKAMURA, N. & HORIKOSHI, K., 1977, "Production of Schardinger  $\beta$ -Dextrin by Soluble and Immobilized Cyclodextrin Glycosyltransferase of an Alkalophilic *Bacillus* sp.", **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, pp. 87-99.
- NAKAMURA, A., HAGA, K. & YAMANE K., 1994, "Four Aromatic Residues in the Active Center of Cyclodextrin Glucanotransferase from Alkalophilic *Bacillus* sp. 1011: Effects of Replacements on Substrate Binding and Cyclization Characteristics", **Biochemistry**, v. 33, pp. 9929-9936.
- NORMAN, B. E. & JORGENSEN, T., 1992, "*Thermoanaerobacter* sp. CGTase: Its Properties and Application", **Denpun Kagaku**, v. 39, n. 2, pp. 101-108.
- OKADA, T., ITO, M. & HIBINO, K., 1994a, "Intermolecular Transglycosylating Reaction of Cyclodextrin Glucanotransferase Immobilized on Capillary Membrane", **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 3, pp. 264-267.
- OKADA, T., ITO, M. & HIBINO, K., 1994b, "Immobilization of Cyclodextrin Glucanotransferase on Capillary Membrane", **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 3, pp. 259-263.
- PEDERSEN, S., KIJKHUIZEN, L., DIJKSTRA, B. W., JENSEN, B. F. & JORGENSEN, S. T., 1995, "A Better Enzyme for Cyclodextrins", **Chemtech**, December, pp. 19-25.
- PENNINGA, D., FABER, O. G., STROKOPYTOV, B., ROZEBOOM, H., DIJKSTRA, B. W. & DIJKHUIZEN, L., 1993, **Engineering the Product Specificity of Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) from *Bacillus Circulans* Strain 251**, Poster of the Sixth European Congress on Biotechnology, Department of Microbiology, University of Groningen, The Netherlands, 4 p.
- PERRY, R. H. & CHILTON, C. H., 1980, **Manual de Engenharia Química**, 5th ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Dois S.A., Seção 21, p. 40.

- PONGSAWASDI, P. & YAGISAWA, M., 1987, "Screening and Identification of a Cyclomaltodextrin Glucanotransferase-Producing Bacteria", **Journal Fermentation Technology**, v. 65, n. 4, pp. 463-467.
- PSZCZOLA, D. E., 1988, "Production and Potential Food Applications of Cyclodextrins", **Food Technology**, v. 42, pp. 96-100.
- RIBA, J. P. & COUDERC, J. P., 1977, "Expansion de Couches Fluidisées par des Liquides", **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v.55, April, pp. 118-121.
- RICHARDSON, J. H. & ZAKI, W. N., 1954, "Sedimentation and Fluidisation – Part I", **Transactions Institution Chemical Engineers**, v. 32, pp. 35-53.
- SABIONI, J. G. & PARK, Y.K., 1992, "Production and Characterization of Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus lentus*", **Starch**, v.44, n. 6, pp. 225-229.
- SAKAI, S., YAMAMOTO, N., YOSHIDA, S., MIKUNI, K., ISHIGAMI, H. & HARA, K., 1991, "Continuous Production of Glucosyl-cyclodextrins Using Immobilized Cyclomaltodextrin Glucanotransferase", **Agricultural Biological Chemistry**, v. 55, n. 1, pp. 45-51.
- SAKANO, Y., SHIRAISHI, T., KUSANO, S., KOGURE, Y., NORMAN, B. E. & YOSHIDA, Y., 1988, "Immobilization of Pullulanase and Successive Synthesis of Branched Cyclodextrins by Immobilized Pullulanase". In: HUBER, O. & SZEJTLI, J. (eds), **Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins**, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 55-59.
- SCHMID, G., 1989, "Cyclodextrin Glycosyltransferase Production: Yield Enhancement by Over Expression of Cloned Genes", **Tibtech**, v. 7 (Sep), pp. 244-248.
- SEGEL, I. H., 1975, **Enzyme Kinetics**, New York, John Wiley & Sons, p. 78.
- SICARD, P. J. & SANIEZ, M. H., 1987, "Biosynthesis of Cycloglycosyltransferase and Obtention of its Enzymatic Reaction Products". In: DUCHÊNE, D. (ed), **Cyclodextrins and their Industrial Uses**, Chapter 2, Paris, France, Editions de Santé.

- STEIGHARDT, J. & KLEINE, R., 1993, "Production and Immobilization of a Proteinase-reduced Cyclodextrin Glycosyltransferase Preparation", **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 39, pp. 63-68.
- SU, C. S. & YANG, C. P., 1990, "A Novel Method for Continuous Production of Cyclodextrins Using an Immobilized Enzyme System", **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 48, pp. 313-323.
- SZEJTLI, J., 1986, "Cyclodextrin in Biotechnology", **Starch**, v. 38, pp. 388-390.
- SZEJTLI, J., 1988, **Cyclodextrin Technology**, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- SZEJTLI, J., 1990, "The cyclodextrins and their applications in biotechnology". In: **Carbohydrate Polymers**, v. 12, Elsevier Science Publishers Ltd, pp. 375-392.
- SZEJTLI, J., 1991, "The Use of Cyclodextrins in Biotechnological Operations". In: DUCHÊNE, D. (ed), **New Trends in Cyclodextrins and Derivatives**, chapter 17, Paris, France, Editions de Santé.
- TSUCHIYAMA, Y., YAMAMOTO, K. I. ASOU, T., OKABE, M., YAGI, Y. & OKAMOTO, R., 1991, "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, pp. 407-412.
- TSUCHIYAMA, Y., NOMURA, H., OKABE, M., et al., 1991, "A Novel Process of Cyclodextrin Production by the Use of Specific Adsorbents: Part II. A New Reactor System for Selective Production of  $\alpha$ -Cyclodextrin with Specific Adsorbent", **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 71, n. 6, pp. 413-417.
- VAUTION, C., HUTIN, M., GOMOT, F. & DUCHÊNE, D., 1987, "The Use of Cyclodextrins in Various Industries". In: DUCHÊNE, D. (ed), **Cyclodextrins and their Industrial Uses**, Chapter 8, Paris, France, Editions de Santé.
- VIKMON, M., 1981, "Rapid and Simple Spectrophotometric Method for Determination of Microamounts of Cyclodextrins". In: SZEJTLI, J. (ed), **The First International**

**Symposium on Cyclodextrin.** Dordrecht, D. Ridel Publishing Company, pp. 69-74.

YANG, C. P. & SU, C. S., 1989, "Study of Cyclodextrin Production Using Cyclodextrin Glycosyltransferase Immobilized on Chitosan", **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.46, pp. 283-294.

ZANIN, G. M., 1989, **Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglicosidase Imobilizada**, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 499 p.

## 8 – ANEXOS

### 8.1 - ANEXO 1 - TEORIA DA COMPLEXAÇÃO

A determinação da concentração de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) utilizando o método de dosagem colorimétrico pela fenolftaleína (PHE), baseia-se na formação de um complexo entre o corante e a molécula de ciclodextrina a dosar, que causa redução da intensidade de cor da solução. O descoloramento da solução, devido à complexação das moléculas de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD com a fenolftaleína é muito mais marcante para a  $\beta$ -CD, sendo portanto este método preferencialmente utilizado para a determinação desta CD.

Como o complexo PHE-CD possui uma absorvância diferente da PHE livre, isso permite quantificar a CD presente na amostra. No entanto, a relação entre a absorvância e a concentração de  $\beta$ -CD, somente permanece linear para concentrações até 0,4 mM. Acima deste limite, faz-se necessário o uso da teoria da complexação, que fornece a relação não linear entre a absorvância e a concentração de  $\beta$ -CD, como descrito por HAMON & MORAES (1990).

Assumindo-se a formação de um complexo com apenas uma molécula hóspede (a PHE) e uma molécula hospedeira (a CD), e tratando-se a formação do complexo como uma reação reversível que está em equilíbrio na solução de dosagem, obtém-se:



onde:

a = concentração total de fenolftaleína;

x = concentração total de ciclodextrina;

w = concentração do complexo ciclodextrina-fenolftaleína;

(a - w) = concentração da fenolftaleína livre

(x - w) = concentração da ciclodextrina livre

Estando a reação de complexação 8.1 em equilíbrio, define-se a constante de equilíbrio termodinâmica (K) segundo a equação 8.2:

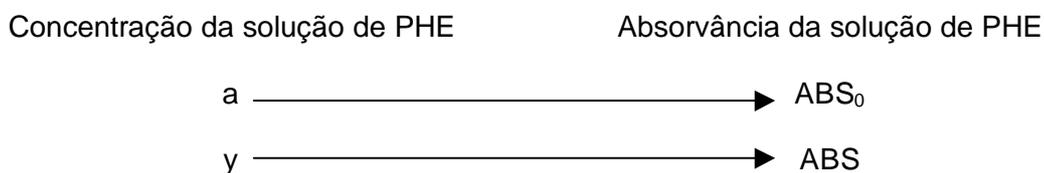
$$K = w / [ (a-w) (x-w) ] \quad (8.2)$$

Isolando-se  $w$  e  $x$  a partir da equação 8.2 resulta:

$$w = (1/2)\{(a + x + 1 / K) - [(a + x + 1/K)^2 - 4 a x]^{1/2}\} \quad (8.3)$$

$$x = w \{ 1 + 1 / [ K (a - w) ] \} \quad (8.4)$$

Chamando-se a concentração da fenolftaleína livre de  $y$ , isto é,  $y = a-w$ , e sabendo-se que complexo CD-PHE é incolor, isto é, sua absorvância é zero, conclui-se que a absorvância da solução de dosagem é diretamente proporcional à concentração de fenolftaleína livre:



logo:

$$y \cdot ABS_0 = a \cdot ABS, \text{ ou}$$

$$y = a (ABS / ABS_0) \quad (8.5)$$

onde:

$ABS$  = absorvância da solução de dosagem na presença de ciclodextrina

$ABS_0$  = absorvância da solução de dosagem na ausência de ciclodextrina

Substituindo-se  $w = (a - y)$  e  $(a - w) = y$  nas equações 8.3 e 8.4 tem-se:

$$y = 1/2 \{ [ a - ( x + 1/K ) ] + [ ( a + x + 1/K )^2 - 4 a x ]^{1/2} \} \quad (8.6)$$

ou equivalentemente:

$$y = ( 1 / 2K ) \{ - [ 1 + K(x - a) ] + [ ( 1 + K(x - a) )^2 + 4 K a ]^{1/2} \} \quad (8.7)$$

e:

$$x = (a - y) [ 1 + 1 / ( K y ) ] \quad (8.8)$$

Substituindo a equação 8.5 nas equações 8.6 e 8.8 obtém-se:

$$ABS = ( ABS_0 / 2a ) \{ [ a - (x + 1/K) ] + [ (a + x + 1/K)^2 - 4ax ]^{1/2} \} \quad (8.9)$$

$$x = a ( 1 - ABS/ABS_0 ) [ 1 + ABS_0 / ( K a ABS ) ] \quad (8.10)$$

As equações 8.9 e 8.10 servem respectivamente para o cálculo da absorvância da solução de dosagem ou da concentração de ciclodextrina na amostra, nas condições de dosagem.

### 8.1.1 - PROCESSO DE CÁLCULO DA CONSTANTE DE EQUILÍBRIO (K)

De acordo com o protocolo descrito no item 3.2.1.1 obtém-se dados de absorvância (ABS) em função da concentração de  $\beta$ -CD (x). A constante de equilíbrio da reação de complexação (K) é, obtida pelo ajuste não linear (por exemplo o método Quasi-Newton, utilizando o Software STATISTICA) dos dados à equação 8.10.

### 8.1.2 - CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE CD DE UMA AMOSTRA

Toma-se a amostra na qual deseja-se determinar a concentração de ciclodextrina e segue-se o procedimento de dosagem descrito no item 3.2.1.1, obtendo-se o valor da absorvância para a amostra (ABS). Em seguida, aplica-se a equação (8.10) obtendo-se o valor de x, que é a concentração da ciclodextrina nas condições de dosagem.

O valor da concentração de CD na amostra é calculado pela multiplicação do valor de x por 6000, que advém da diluição da amostra nas condições do teste: de 0,5 a 3,0 mL, e da transformação da concentração de moles/litro (M) a milimolar (mM), como indicado na apresentação da equação 3.1.

## 8.2 - ANEXO 2 - INTERFERÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE DEXTRINA E $\gamma$ -CD NA DOSAGEM DE $\beta$ -CD

A dosagem de  $\beta$ -CD, na presença de  $\gamma$ -CD e elevadas concentrações de dextrina induz a valores calculados para a concentração de  $\beta$ -CD que são mais elevados que os reais. HAMON & MORAES (1990) propuseram um método para a correção desses valores, baseado na teoria da complexação.

Nas amostras diluídas, o descoloramento da fenolftaleína devido à  $\gamma$ -CD e à dextrina pode ser considerado como aditivo e para se obter o valor da absorvância correspondente somente a  $\beta$ -CD ( $ABS_{\beta\text{-CD}}$ ), basta adicionar ao valor lido a 550 nm, o excesso de absorvância causada pela interferência da  $\gamma$ -CD ( $\Delta ABS_{\gamma\text{-CD}}$ ) e da dextrina ( $\Delta ABS_{\text{dext}}$ ), calculados com as equações 8.11 a 8.14.

$$\Delta ABS_{\gamma\text{-CD}} = ABS_0 - ABS(C_{\gamma\text{-CD}}) \quad (8.11)$$

$$\Delta ABS_{\text{dext}} = ABS_0 - ABS(C_{\text{dext}}) \quad (8.12)$$

$$ABS(C_{\gamma\text{-CD}}) = y_{\gamma\text{-CD}} \times ABS_0 / a \quad (8.13)$$

$$ABS(C_{\text{dext}}) = y_{\text{dext}} \times ABS_0 / a \quad (8.14)$$

onde:

$\Delta ABS_{\gamma\text{-CD}}$  = excesso de absorvância causado pela interferência da  $\gamma$ -CD, na dosagem da  $\beta$ -CD pelo método da fenolftaleína;

$\Delta ABS_{\text{dext}}$  = excesso de absorvância causado pela interferência da dextrina, na dosagem da  $\beta$ -CD pelo método da fenolftaleína;

$a$  = concentração total de fenolftaleína no meio de análise.

Os valores de  $y_{\gamma\text{-CD}}$  e  $y_{\text{dext}}$  são determinados pela equação 8.7, onde o valor da constante de equilíbrio para  $\beta$ -CD ( $K_{\beta\text{-CD}}$ ),  $\gamma$ -CD ( $K_{\gamma\text{-CD}}$ ) e Dextrina ( $K_{\text{dext}}$ ), são estimados pelo ajuste não linear (por exemplo o método Quasi-Newton, usado no Software STATISTICA ) dos dados de absorvância (ABS) em função de concentrações conhecidas, utilizando-se como modelo estimativo a equação 8.10.

O procedimento de cálculo das concentrações reais de  $\beta$ -CD, baseia-se num processo iterativo e consiste nas seguintes etapas:

- 1) Com a absorvância da amostra (  $ABS_{\beta-CD1}$  ), lida a 550 nm, faz-se uma primeira aproximação da concentração de  $\beta$ -CD (  $C_{\beta-CD1}$  ), utilizando a equação 8.10;
- 2) Determina-se a concentração de  $\gamma$ -CD (  $C_{\gamma-CD}$  ), a partir da absorvância lida a 620 nm (  $ABS_{\gamma-CD}$  ), utilizando a curva de calibração obtida pelo método de dosagem do Verde de Bromocresol, descrito no item 3.2.1.2.
- 3) Calcula-se a concentração de dextrina (  $C_{DEXT}$  ), utilizando a equação 8.15;

$$C_{DEXT} = C_{DEXT_0} - C_{\gamma-CD} - C_{\beta-CD1} \quad (8.15)$$

onde:  $C_{DEXT_0}$  = concentração inicial de dextrina

- 4) Com  $C_{\gamma-CD}$ ,  $C_{DEXT}$ ,  $K_{\gamma-CD}$  e  $K_{dext}$ , calcula-se  $\Delta ABS_{\gamma-CD}$  e  $\Delta ABS_{dext}$ , utilizando as equações 8.7 e 8.11 a 8.14;
- 5) Faz-se uma segunda aproximação da concentração de  $\beta$ -CD (  $C_{\beta-CD2}$  ), utilizando a equação 8.10, com a absorvância dada pela equação 8.14;

$$ABS_{\beta-CD2} = ABS_{\beta-CD1} + \Delta ABS_{\gamma-CD} + \Delta ABS_{dext} \quad (8.14)$$

- 6) O teste para finalização do processo iterativo é feito comparando os valores de  $C_{\beta-CD2}$  e  $C_{\beta-CD1}$ . Se o módulo da diferença entre as duas concentrações for inferior a um valor pré estabelecido, por exemplo 0,0001, o valor de  $C_{\beta-CD2}$  corresponde ao valor real da concentração de  $\beta$ -CD. Caso contrário deve-se voltar à etapa 3, fazendo-se  $C_{\beta-CD1} = C_{\beta-CD2}$ , até que o processo iterativo alcance convergência.

### 8.3 - ANEXO 3 – LISTAGENS DOS PROGRAMAS PARA O CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE $\beta$ -CD

#### 8.3.1 - PROGRAMA 1

REM Programa CALC-BETA

REM Objetivo: Cálculo da concentração de  $\beta$ -CD, nos diversos testes de atividade da enzima CGTase, considerando a interferência da concentração de  $\gamma$ -CD e dextrina na leitura da absorvância a 550 nm, pelo método de dosagem da fenoltaleína

DIM t(50), AB(50), CG(50), DOG(50), DOD(50), DOB(50), CD(50), CB(50), niter(50)

REM Condições do teste de produção de ciclodextrinas

TEMP = 50!: pH = 8!: REM Substrato: Dextrina 10 Fluka

REM Definição e descrição das variáveis:

KB = 18014,82: REM KB = constante de equilíbrio para a  $\beta$ -CD na complexação com a PHE

KD = 47,21: REM KD = constante de equilíbrio para a Dextrina na complexação com a PHE

KG = 2106,52: REM KG = constante de equilíbrio para a  $\gamma$ -CD na complexação com a PHE

a = 0,00005: REM a = concentração molar da PHE na dosagem da  $\beta$ -CD

PMB = 1135!: REM PMB=peso molecular da  $\beta$ -CD em g/mol

PMD = 1672!: REM PMD=peso molecular médio da Dextrina em g/mol

PMG = 1297,14: REM PMG=peso molecular da  $\gamma$ -CD em g/mol

NI = 100: REM NI=número de iterações admissíveis para alcançar convergência

fdil = 1 / 6000!: REM fdil = fator de diluição e transformação da concentração da amostra em mM para a concentração na condição de dosagem, expressa em M. No teste usa-se 0,5 mL de amostra e 2,5 mL de solução trabalho de PHE.

CLS

PRINT "PROGRAMA PARA CORREÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE  
 $\beta$ -CICLODEXTRINA"

REM CD0=concentração inicial de dextrina ( g/L )

INPUT "concentração inicial de dextrina em g/L = ?", CD0

CD1 = CD0

REM NP = número de pontos da Tabela de Dados

```
INPUT "Número de pontos da Tabela de Dados = ? ", NP
INPUT "Diluição na dosagem de  $\beta$ -CD = ? ", dilBCD
CD0 = CD0 / dilBCD
INPUT "ABS0=absorvância do Branco (com água), na dosagem da  $\beta$ -CD ="; ABS0
REM Cálculo de constantes que se repetem
ADP = a / ABS0: PDA = ABS0 / a
PMBdMil = PMB / 1000!: PMGdMil = PMG / 1000!: PMDdMil = PMD / 1000!
INPUT "Os dados serão lidos de arquivo ( 1=SIM, 0=NÃO) = ? ", CONF
IF CONF = 0 GOTO 500
OPEN "I", #1, "D:\Prog-BAS\Tabdados\Arquivo.txt"
REM Leitura do Arquivo de dados
REM t(i)=tempo, em minutos, da coleta das amostras no reator
REM AB(i)=absorvância lida a 550 nm na dosagem da  $\beta$ -CD com PHE. Este valor contém
    as interferências da dextrina e da  $\gamma$ -CD.
REM CG(i)=concentração em mM da  $\gamma$ -CD
FOR i = 1 TO NP
INPUT #1, t(i), AB(i), CG(i): NEXT i: CLOSE #1: GOTO 550
500 CLS
FOR i = 1 TO NP
INPUT "Tempo (min) =?", t(i): CLS
INPUT "Absorvância da dosagem de  $\beta$ -CD =?", AB(i): CLS
INPUT "concentração de  $\gamma$ -CD em mM na amostra =?", CG(i): CLS
NEXT i
550 FOR i = 1 TO NP
REM Divisão pela diluição da amostra da  $\beta$ -CD
CG(i) = CG(i) / dilBCD
NEXT i
REM Procedimento de cálculo para correção das interferências da dextrina e da  $\gamma$ -CD
    sobre a dosagem da  $\beta$ -CD
REM DOD(i)=excesso de absorvância causada pela interferência da dextrina
REM DOG(i)=excesso de absorvância causada pela interferência da  $\gamma$ -CD
REM DOB(i)=absorvância devida exclusivamente à  $\beta$ -CD
REM CB(i)=concentração de  $\beta$ -CD na amostra em mM
FOR i = 1 TO NP
Y = AB(i): K = KB: GOSUB 6000: CB(i) = X
X = CG(i): K = KG: GOSUB 5000: DOG(i) = ABS0 - Y
```

```

CDX = CD0 - CG(i) * PMGdMil
REM Loop de iteração para correção das interferências
REM CD(i)=concentração de dextrina na amostra em g/L
FOR j = 1 TO NI
CD(i) = CDX - CB(i) * PMBdMil
X = CD(i) / PMDdMil: K = KD: GOSUB 5000: DOD(i) = ABS0 - Y
DOB(i) = AB(i) + DOG(i) + DOD(i)
Y = DOB(i): K = KB: GOSUB 6000
DIFB = ABS(CB(i) - X): CB(i) = X
IF DIFB < 0,000001 GOTO 600
NEXT j
LOCATE 1, 1: PRINT "Erro = Alcançou o número de iterações admissíveis";
PRINT DIFB
600 niter(i) = j: NEXT i
REM Restauração das concentrações ao nível do reator
FOR i = 1 TO NP
CB(i) = CB(i) * dilBCD!: CG(i) = CG(i) * dilBCD!: CD(i) = CD(i) * dilBCD!: GOTO 800
800 NEXT i
CB(1) = 0: CG(1) = 0: CD(1) = CD1!
REM Seleção do tipo de impressão dos dados
900 PRINT "Deseja imprimir a Tabela de dados na tela ou impressora "
INPUT "t ou i "; tab$
IF tab$ = "i" GOTO 2000
IF tab$ = "t" GOTO 3000 ELSE GOTO 900
REM Impressão da tabela de dados de Produção de  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD e consumo de dextrina,
em função do tempo de reação
2000 LPRINT "Teste de produção de ciclodextrinas "
LPRINT "Substrato: Dextrina Fluka 10, artigo 31412"; " , T = "; TEMP; "°C"; " , pH = "; pH
LPRINT "ABS0=absorvância do branco (com água), na dosagem da  $\beta$ -CD="; ABS0
LPRINT
LPRINT "Atenção: As concentrações desta tabela já estão multiplicadas pela diluição"
LPRINT : LPRINT " n° t  $\beta$ -CD  $\gamma$ -CD Dext n°iter ABS DOG DOD"
LPRINT " (min) (mM) (mM) (g/L)": LPRINT
FOR i = 1 TO NP
LPRINT USING "###"; i : LPRINT USING "#####.#####"; t(i); CB(i); CG(i); CD(i);
LPRINT USING "#####"; niter(i) : LPRINT USING "##.#####"; AB(i); DOG(i); DOD(i)

```

```

NEXT i: END
3000 GOSUB 7000
FOR i = 1 TO NP
IF i MOD 15 <> 0 GOTO 4000
PRINT : STOP: GOSUB 7000
4000 PRINT USING "###"; i; : PRINT USING "#####.###"; t(i); CB(i); CG(i); CD(i);
PRINT USING "#####"; niter(i); : PRINT USING "##.###"; AB(i); DOG(i); DOD(i)
NEXT i: END
REM Subrotina de cálculo de ABS em função da concentração, pela Teoria da
Complexação
5000 XT = X * fdil: B = -(1! + K * (XT - a))
C = SQR(B * B + 4! * K * a): Y = (B + C) / (2! * K)
Y = Y * PDA: RETURN
REM Subrotina de cálculo da concentração em função de ABS, pela Teoria da
Complexação
6000 YT = Y * ADP: X = (a - YT)
IF X < 0 THEN 6100 ELSE 6200
6100 PRINT "ERRO: A absorvância do branco com água está muito baixa ou a do ponto
é muito alta"
STOP
6200 X = X * (1! + 1! / (K * YT))
X = X / fdil: RETURN
7000 CLS : PRINT
PRINT "Teste de produção de ciclodextrinas "
PRINT "Substrato: Dextrina 10 (Fluka); " , T = " ; TEMP; "°C"; " , pH = " ; pH
PRINT "ABS0=absorvância do branco (com água), na dosagem da β-CD="; ABS0
PRINT
PRINT "Atenção: As concentrações desta tabela já estão multiplicadas pela diluição"
PRINT : PRINT " n° t β-CD γ-CD Dext n°iter ABS DOG DOD"
PRINT " (min) (mM) (mM) (g/L)": PRINT
RETURN

```

### 8.3.2 - PROGRAMA 2

REM Programa CALC-BETA

REM Objetivo: Cálculo da concentração de  $\beta$ -CD das amostras do teste de produção de CDs no reator de leito fluidizado, com a enzima CGTase imobilizada, considerando a interferência da concentração de  $\gamma$ -CD e dextrina na leitura da absorvância a 550 nm, pelo método de dosagem da fenoltaleína

DIM t(50), AB(50), CG(50), DOG(50), DOD(50), DOB(50), CD(50), CB(50), niter(50)

REM Condições do teste de produção de ciclodextrinas

TEMP = 50!: pH = 8!: REM Substrato: Dextrina 10 Fluka

REM Definição e descrição das variáveis:

KB = 17078,53: REM KB = constante de equilíbrio para a  $\beta$ -CD na complexação com PHE

KD = 47,21: REM KD = constante de equilíbrio para a Dextrina na complexação com a PHE

KG = 2106,52: REM KG = constante de equilíbrio para a  $\gamma$ -CD na complexação com a PHE

a = 0,00005: REM a = concentração molar da PHE na dosagem da  $\beta$ -CD

PMB = 1135!: REM PMB=peso molecular da  $\beta$ -CD em g/mol

PMD = 1672!: REM PMD=peso molecular médio da Dextrina em g/mol

PMG = 1297,14: REM PMG=peso molecular da  $\gamma$ -CD em g/mol

NI = 100: REM NI=número de iterações admissíveis para alcançar convergência

fdil = 1 / 6000!: REM fdil = fator de diluição e transformação da concentração da amostra em mM para a concentração na condição de dosagem, expressa em M. No teste usa-se 0,5 mL de amostra e 2,5 mL de solução trabalho de PHE.

CLS

PRINT "PROGRAMA PARA CORREÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE  
 $\beta$ -CICLODEXTRINA"

REM CD0=concentração inicial de dextrina ( g/L )

INPUT "concentração inicial de dextrina em g/L = ?", CD0

CD1 = CD0

INPUT "Tempo de Reação "; TEMPO

REM NP = número de pontos da Tabela de Dados

INPUT "Número de pontos da Tabela de Dados = ? ", NP

```
INPUT "Diluição na dosagem de  $\beta$ -CD = ? ", dilBCD
CD0 = CD0 / dilBCD
INPUT "ABS0=absorvância do branco (com água), na dosagem da  $\beta$ -CD ="; ABS0
REM Cálculo de constantes que se repetem
ADP = a / ABS0: PDA = ABS0 / a
PMBdMil = PMB / 1000!: PMGdMil = PMG / 1000!: PMDdMil = PMD / 1000!
INPUT "Os dados serão lidos de arquivo ( 1=SIM, 0=NÃO) = ? ", CONF
IF CONF = 0 GOTO 500
OPEN "I", #1, "D:\Prog-BAS\Tabdados\Arquivo.txt"
REM Leitura do Arquivo de dados
REM m(i)=massa de enzima imobilizada no reator, em gramas
REM AB(i)=absorvância lida a 550 nm na dosagem da  $\beta$ -CD com PHE. Este valor contem
    as interferências da dextrina e da  $\gamma$ -CD.
REM CG(i)=concentração em mM da  $\gamma$ -CD
FOR i = 1 TO NP
INPUT #1, m(i), AB(i), CG(i): NEXT i: CLOSE #1: GOTO 550
500 CLS
FOR i = 1 TO NP
INPUT "Massa de E.I. ( g ) =?", m(i): CLS
INPUT "Absorvância da dosagem de  $\beta$ -CD =?", AB(i): CLS
INPUT "concentração de  $\gamma$ -CD em mM na amostra =?", CG(i): CLS
NEXT i
550 FOR i = 1 TO NP
REM Divisão pela diluição da amostra da  $\beta$ -CD
CG(i) = CG(i) / dilBCD
NEXT i
REM Procedimento de cálculo para correção das interferências da dextrina e da  $\gamma$ -CD
    sobre a dosagem da  $\beta$ -CD
REM DOD(i)=excesso de absorvância causada pela interferência da dextrina
REM DOG(i)=excesso de absorvância causada pela interferência da  $\gamma$ -CD
REM DOB(i)=absorvância devida exclusivamente à  $\beta$ -CD
REM CB(i)=concentração de  $\beta$ -CD na amostra em mM
FOR i = 1 TO NP
Y = AB(i): K = KB: GOSUB 6000: CB(i) = X
X = CG(i): K = KG: GOSUB 5000: DOG(i) = ABS0 - Y
CDX = CD0 - CG(i) * PMGdMil
```

```

REM Loop de iteração para correção das interferências
REM CD(i)=concentração de dextrina na amostra em g/l
FOR j = 1 TO NI
  CD(i) = CDX - CB(i) * PMBdMil
  X = CD(i) / PMDdMil: K = KD: GOSUB 5000: DOD(i) = ABS0 - Y
  DOB(i) = AB(i) + DOG(i) + DOD(i)
  Y = DOB(i): K = KB: GOSUB 6000
  DIFB = ABS(CB(i) - X): CB(i) = X
  IF DIFB < 0,000001 GOTO 600
NEXT j
LOCATE 1, 1: PRINT "Erro = Alcançou o número de iterações admissíveis";
PRINT DIFB
600 niter(i) = j: NEXT i
REM Restauração das concentrações ao nível do reator
FOR i = 1 TO NP
  CB(i) = CB(i) * dilBCD!: CG(i) = CG(i) * dilBCD!: CD(i) = CD(i) * dilBCD!: GOTO 800
800 NEXT i
CB(1) = 0: CG(1) = 0: CD(1) = CD1!
REM Seleção do tipo de impressão dos dados
900 PRINT "Deseja imprimir a Tabela de dados na tela ou impressora "
INPUT "t ou i "; tab$
IF tab$ = "i" GOTO 2000
IF tab$ = "t" GOTO 3000 ELSE GOTO 900
REM Impressão da tabela de dados de produção de  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD e consumo de dextrina,
em em função do tempo de reação e massa de enzima imobilizada
2000 LPRINT "Teste de produção de ciclodextrinas em Reator de Leito Fluidizado"
LPRINT "Substrato: Dextrina 10 ( Fluka ), artigo 31412"; " , T = "; TEMP; "°C"; " , pH = ";
pH
LPRINT "ABS0=absorvância do branco (com água), na dosagem da  $\beta$ -CD="; ABS0
LPRINT "Diluição na dosagem da  $\beta$ -CD="; dilBCD
LPRINT "Tempo de reação = "; TEMPO; "min"
LPRINT "Atenção: As concentrações desta tabela já estão multiplicadas pela diluição"
LPRINT : LPRINT " n° E.I (g) B-CD G-CD Dext n°iter ABS DOG DOD"
LPRINT " (g) (mM) (mM) (g/L)": LPRINT
FOR i = 1 TO NP
  LPRINT USING "###"; i; : LPRINT USING "#####.#####"; m(i); CB(i); CG(i); CD(i);

```

```
LPRINT USING "#####"; niter(i); : LPRINT USING "##.#####"; AB(i); DOG(i); DOD(i)
NEXT i: END
3000 GOSUB 7000
FOR i = 1 TO NP
IF i MOD 15 <> 0 GOTO 4000
PRINT : STOP: GOSUB 7000
4000 PRINT USING "###"; i; : PRINT USING "#####.#####"; m(i); CB(i); CG(i); CD(i);
PRINT USING "#####"; niter(i); : PRINT USING "##.#####"; AB(i); DOG(i); DOD(i)
NEXT i: END
REM Subrotina de cálculo de ABS em função da conc, pela Teoria da Complexação
5000 XT = X * fdil: B = -(1! + K * (XT - a))
C = SQR(B * B + 4! * K * a): Y = (B + C) / (2! * K)
Y = Y * PDA: RETURN
REM Subrotina de cálculo da conc. em função de ABS, pela Teoria da Complexação
6000 YT = Y * ADP: X = (a - YT)
IF X < 0 THEN 6100 ELSE 6200
6100 PRINT "ERRO: A absorvância do branco com água está muito baixa ou a do ponto
        muito alta
STOP
6200 X = X * (1! + 1! / (K * YT))
X = X / fdil: RETURN
7000 CLS : PRINT
PRINT "Teste de produção de ciclodextrinas "
PRINT "Substrato: Dextrina 10 ( Fluka ); " , T = "; TEMP; "°C"; " , pH = "; pH
PRINT "ABS0=absorvância do branco (com água), na dosagem da β-CD="; ABS0
PRINT "Tempo de reação = "; TEMPO; "min"
PRINT "Atenção: As concentrações desta tabela já estão multiplicadas pela diluição"
PRINT : PRINT " n°   E.I (g)   β-CD   γ-CD   Dext n°iter ABS   DOG   DOD"
PRINT "   (g)   (mM)   (mM)   (g/L)": PRINT
RETURN
```

#### **8.4 - ANEXO 4 – DOSAGEM DE CICLODEXTRINAS PRODUZIDAS EM REATOR DE LEITO FLUIDIZADO EM FUNÇÃO DA MASSA DE ICGTase NO REATOR.**

Na tabela 8.1 apresenta-se as absorvâncias medidas a 550 nm, obtidas pela dosagem das amostras coletadas na saída do reator de leito fluidizado, em função do tempo, e para cada massa de enzima imobilizada usada no reator. O método colorimétrico da fenolftaleína, descrito no item 3.2.1.1, foi empregado nestas dosagens. As concentrações de  $\beta$ -CD foram calculadas pelo programa 2, listado no anexo 3.

Na tabela 8.2 são mostrados os resultados obtidos pela dosagem das mesmas amostras, pelo método colorimétrico do verde de bromocresol, conforme metodologia descrita no item 3.2.1.2. As concentrações de  $\gamma$ -CD foram calculadas utilizando-se a equação 4.15.

As figuras 8.1 a 8.6 mostram as concentrações de ciclodextrina formadas em função do tempo de operação e da massa de biocatalisador no reator. Observa-se nessas figuras que para cada massa de enzima imobilizada, o reator encontrava-se em regime estacionário.



Tabela 8.2 - Dosagem colorimétrica de  $\gamma$ -CD pelo Verde de Bromocresol

M <sub>EI</sub> (g)	Diluição	Absorvância a 620 nm										C <sub>γ-CD</sub> ( mM )					
		10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	10	20	30	40	50	60	Média			
0,0000	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2,8349	1	0,103	0,101	0,110	0,099	0,100	0,099	0,110	0,099	0,100	*****	0,6141	0,5960	0,6773	0,5780	0,5870	0,6322
5,6701	1	0,145	0,138	0,127	0,122	0,121	0,122	0,127	0,122	0,121	0,120	0,9934	0,9302	0,8308	0,7857	0,7766	0,9618
8,5052	1	0,173	0,180	0,177	0,182	0,186	0,182	0,177	0,182	0,186	0,180	1,2463	1,3095	1,2824	1,3275	1,3637	1,3065
11,3401	2	0,110	0,116	0,112	0,114	0,116	0,114	0,112	0,114	0,116	0,118	1,6176	1,7260	1,6537	1,6899	1,7224	1,6953
14,1747	2	0,126	0,125	0,118	0,123	0,126	0,123	0,118	0,123	0,126	0,128	1,9066	1,8885	1,7621	1,8524	1,9066	1,8765
17,0093	2	0,124	0,129	0,121	0,123	0,128	0,123	0,121	0,123	0,128	0,133	1,8705	1,9608	1,8163	1,8524	1,9427	1,9126
19,8440	2	0,133	0,135	0,133	0,138	0,135	0,138	0,133	0,138	0,135	0,136	2,0330	2,0692	2,0330	2,1233	2,0692	2,0692
22,6804	2	0,135	0,134	0,139	0,136	0,136	0,136	0,139	0,136	0,136	0,138	2,0692	2,0511	2,1414	2,0872	2,0872	2,0932
25,5153	2	0,146	0,146	0,145	0,144	0,147	0,144	0,145	0,144	0,147	0,144	2,2678	2,2678	2,2498	2,2317	2,2859	2,2558
28,3502	2	0,147	0,147	0,145	0,151	0,150	0,151	0,145	0,151	0,150	0,145	2,2859	2,2859	2,2498	2,3582	2,3401	2,2949
31,1848	2	0,153	0,155	0,151	0,154	0,155	0,154	0,151	0,154	0,155	0,155	2,3943	2,4304	2,3582	2,4123	2,4304	2,4093
34,0199	2	0,156	0,155	0,152	0,150	0,148	0,150	0,152	0,150	0,148	0,148	2,4485	2,4304	2,3762	2,3401	2,3040	2,3672
36,8557	2	0,155	0,156	0,155	0,163	0,162	0,163	0,155	0,163	0,162	0,159	2,4304	2,4485	2,4304	2,5749	2,5568	2,4906
39,6920	2	0,164	0,166	0,170	0,169	0,171	0,169	0,170	0,169	0,171	0,168	2,5930	2,6291	2,7013	2,6833	2,7194	2,6652
42,5270	2	0,163	0,165	0,167	0,159	0,169	0,159	0,167	0,159	0,169	0,172	2,5749	2,6110	2,6471	2,5026	2,6833	2,7375
45,3615	2	0,161	0,163	0,165	0,162	0,162	0,162	0,165	0,162	0,162	0,165	2,5388	2,5749	2,6110	2,5568	2,5568	2,5749
48,1975	2	0,157	0,155	0,159	0,156	0,161	0,156	0,159	0,156	0,161	0,162	2,4665	2,4304	2,5026	2,4485	2,5388	2,4906
51,0334	2	0,161	0,161	0,159	0,159	0,145	0,159	0,159	0,159	0,145	0,161	2,5388	2,5388	2,5026	2,5026	2,2498	2,5243
53,8698	2	0,160	0,163	0,158	0,161	0,161	0,161	0,158	0,161	0,161	0,160	2,5207	2,5749	2,4846	2,5388	2,5388	2,5297
56,7057	2	0,161	0,164	0,164	0,162	0,159	0,162	0,164	0,162	0,159	0,160	2,5388	2,5930	2,5930	2,5568	2,5026	2,5508
59,5410	2	0,158	0,156	0,165	0,162	0,159	0,162	0,165	0,162	0,159	0,164	2,4846	2,4485	2,6110	2,5568	2,5026	2,5328
62,3775	2	0,168	0,168	0,169	0,168	0,170	0,168	0,169	0,168	0,170	0,169	2,6652	2,6652	2,6833	2,6652	2,7013	2,6772
65,2130	2	0,165	0,172	0,172	0,166	0,163	0,166	0,172	0,166	0,163	0,164	2,6110	2,7375	2,7375	2,6291	2,5749	2,6471
68,0524	2	0,164	0,168	0,169	0,173	0,167	0,173	0,169	0,173	0,167	0,169	2,5930	2,6652	2,6833	2,7555	2,6471	2,6712
70,8874	2	0,172	0,177	0,179	0,181	0,175	0,181	0,179	0,181	0,175	0,183	2,7375	2,8278	2,8639	2,9000	2,7916	2,8428
73,7223	2	0,173	0,175	0,159	0,174	0,171	0,174	0,159	0,174	0,171	0,174	2,7555	2,7916	2,5026	2,7736	2,7194	2,7194
76,5604	2	0,170	0,172	0,176	0,172	0,163	0,172	0,176	0,172	0,163	0,174	2,7013	2,7375	2,8097	2,7375	2,5749	2,7224
88,8480	2	0,176	0,181	0,177	0,174	0,172	0,174	0,177	0,174	0,172	0,175	2,8097	2,9000	2,8278	2,7736	2,7375	2,7506
		0,175	0,170	0,170	0,168	0,162	0,168	0,170	0,168	0,162	*****	2,7916	2,7013	2,7013	2,6652	2,5568	*****

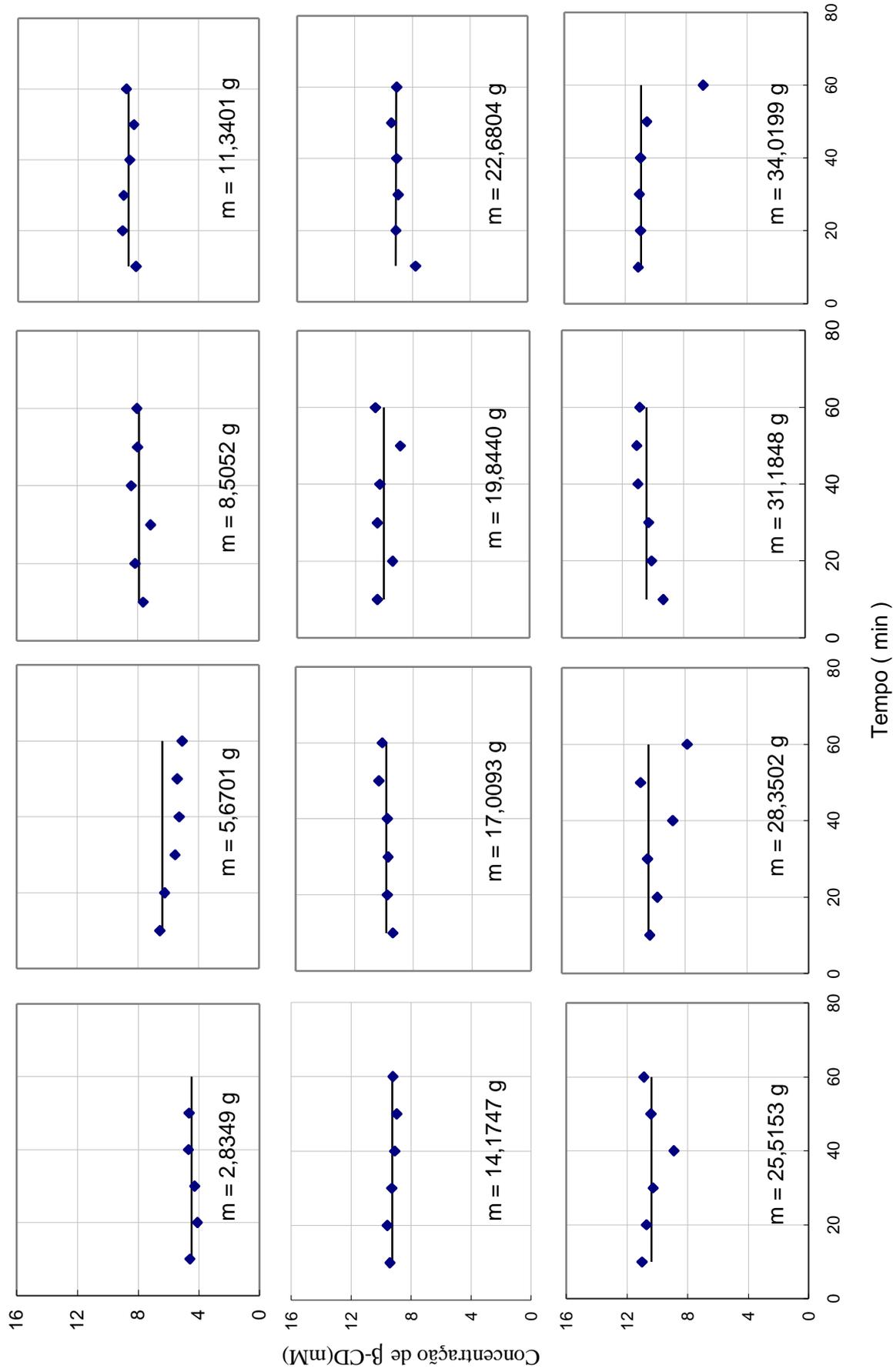


Figura 8.1 - Concentrações de  $\beta$ -CD medidas para as amostras coletadas, em cada de tempo de operação do reator, para uma determinada carga enzimática ( $M_{EI}$ ).

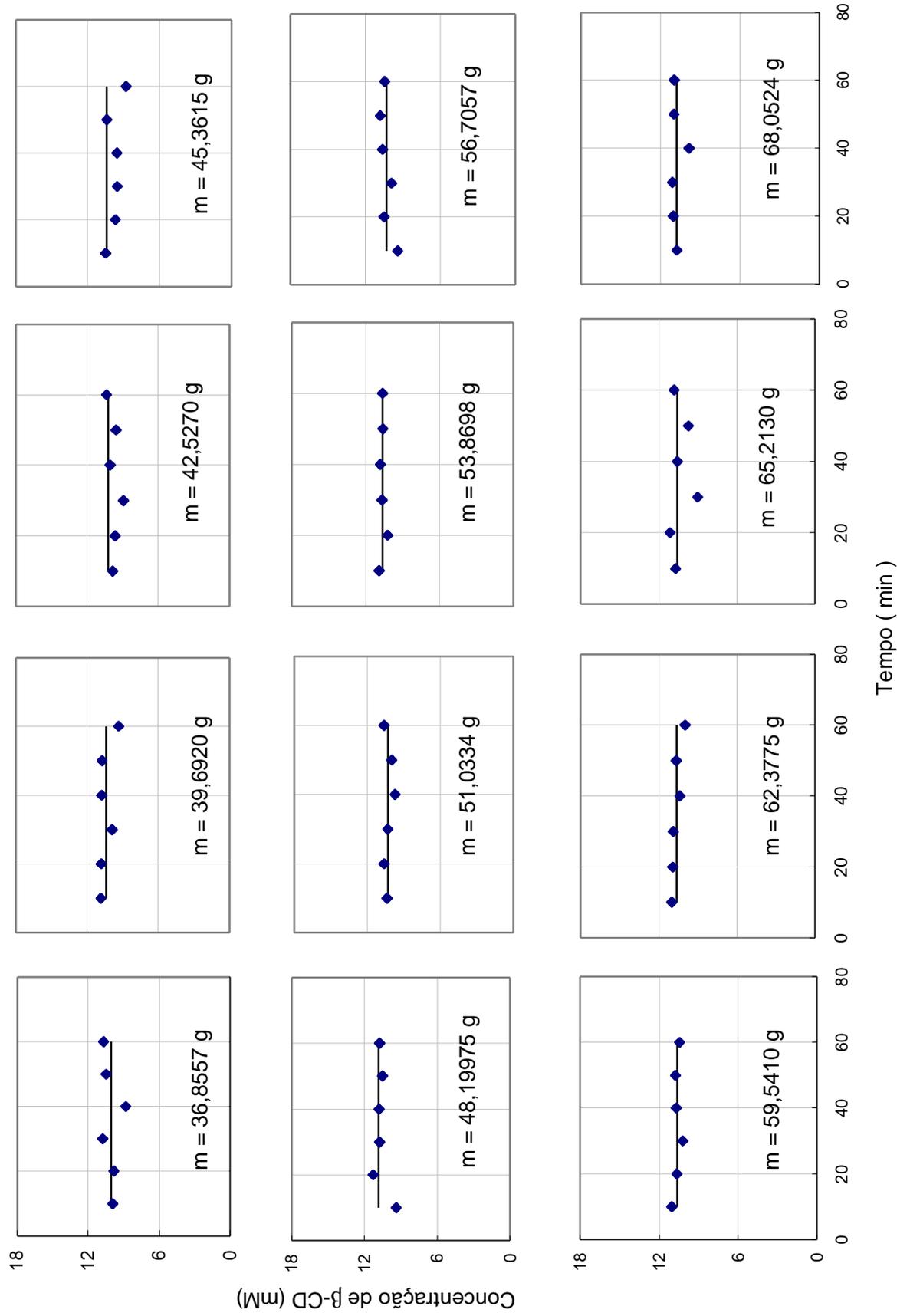


Figura 8.2 - Concentrações de  $\beta$ -CD medidas para as amostras coletadas, em cada de tempo de operação do reator, para uma determinada carga enzimática ( $M_{EI}$ ).

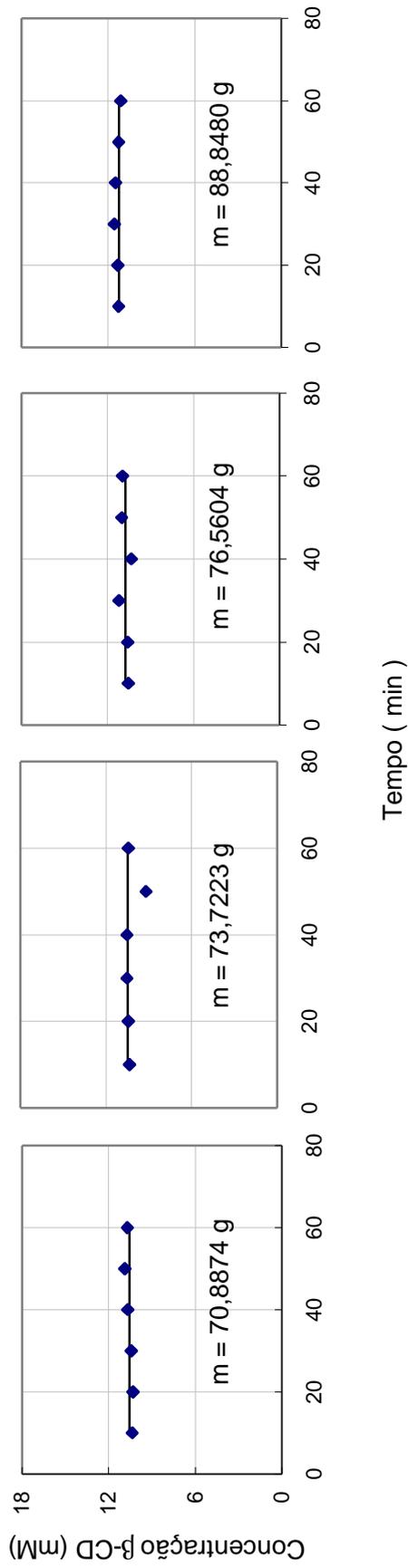


Figura 8.3 - Concentrações de β-CD medidas para as amostras coletadas, em cada de tempo de operação do reator, para uma determinada carga enzimática ( $M_{EI}$ ).

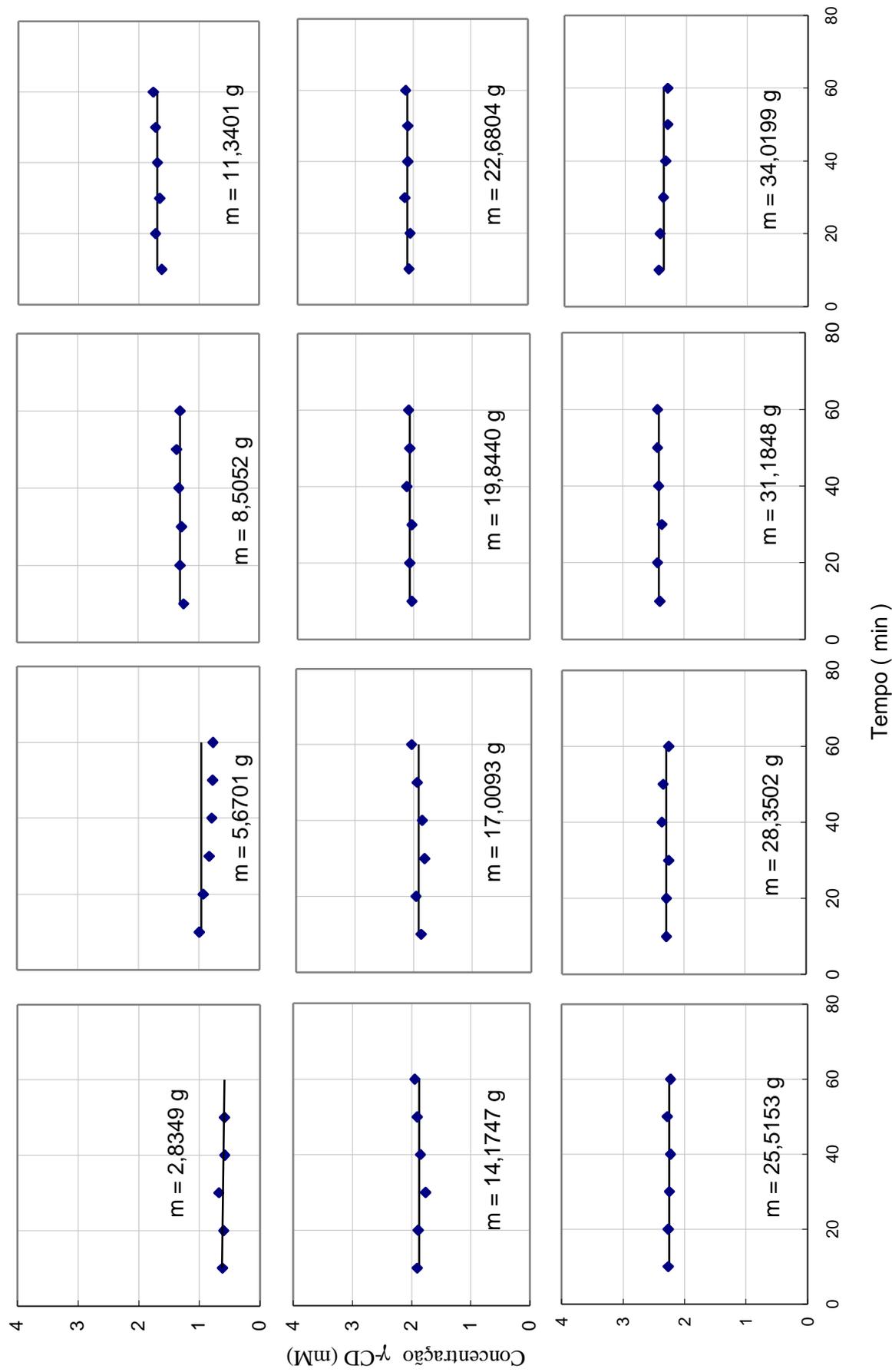


Figura 8.4 - Concentrações de  $\gamma$ -CD medidas para as amostras coletadas, em cada de tempo de operação do reator, para uma determinada carga enzimática ( $M_{EI}$ ).

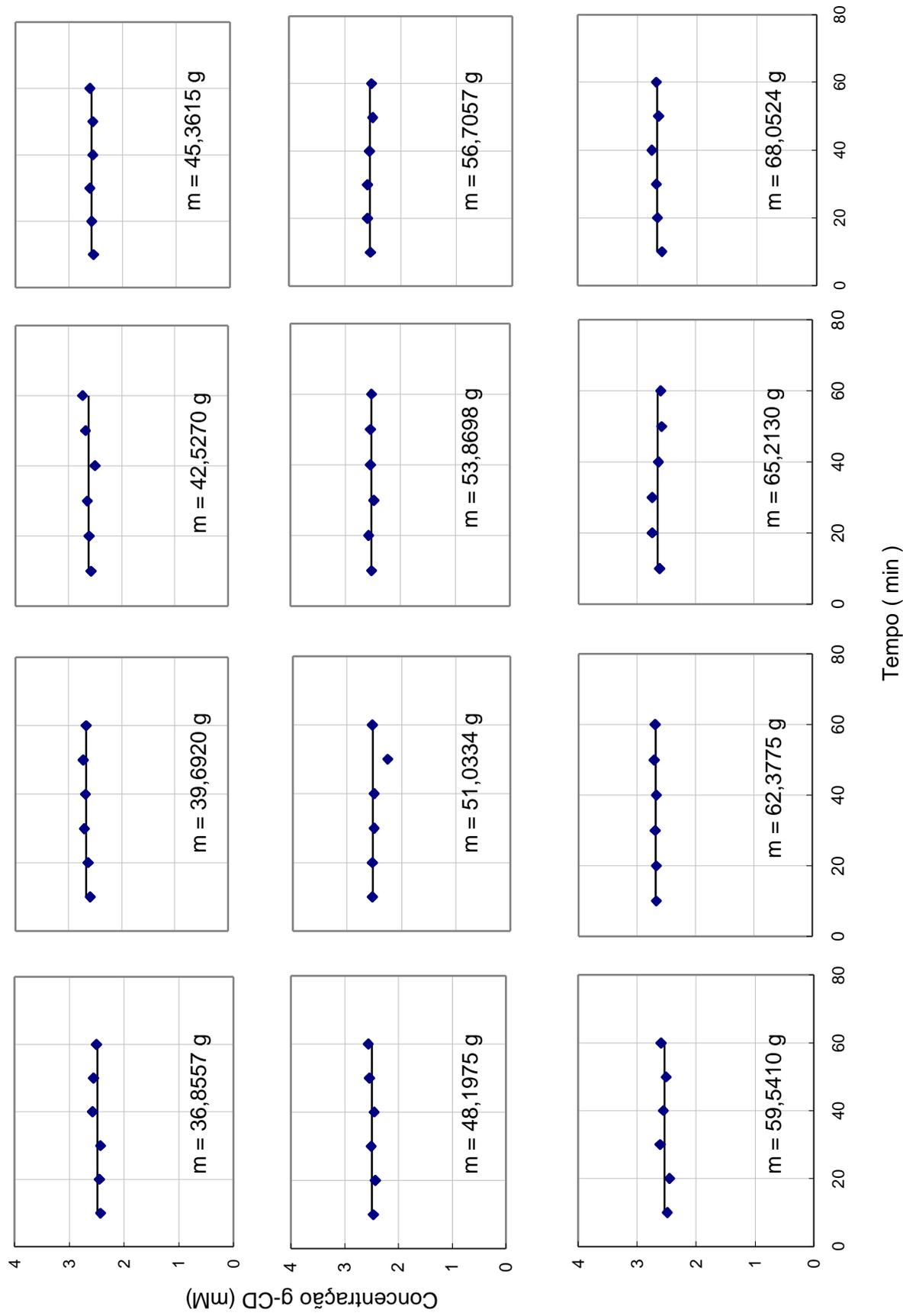


Figura 8.5 - Concentrações de  $\gamma$ -CD medidas para as amostras coletadas, em cada tempo de operação do reator, para uma determinada carga enzimática (M<sub>r</sub>-)

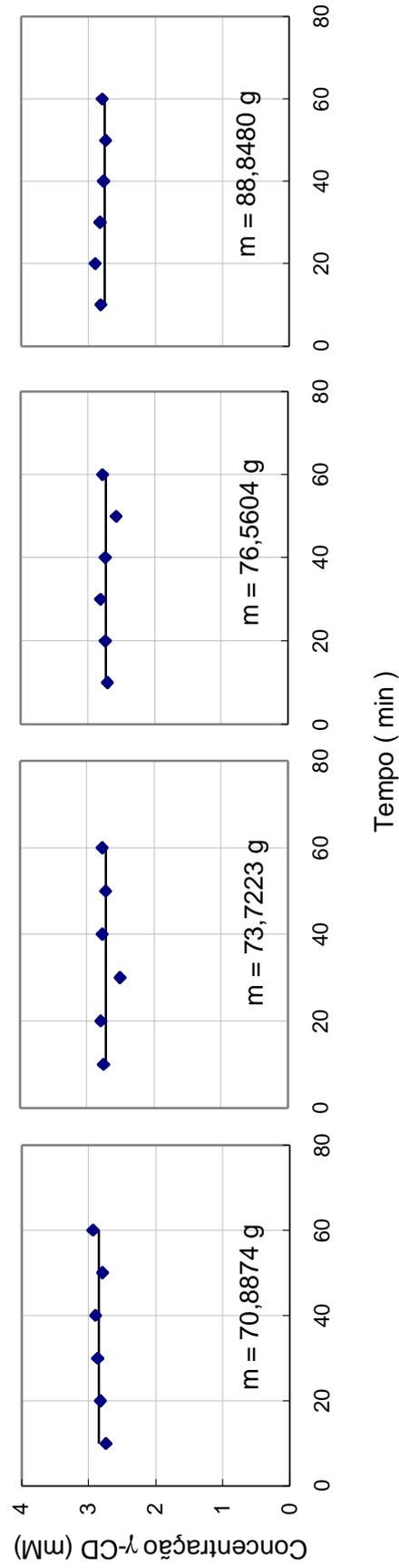


Figura 8.6 - Concentrações de  $\gamma$ -CD medidas para as amostras coletadas, em cada de tempo de operação do reator, para uma determinada carga enzimática ( $M_{E1}$ ).