

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

CLEITON DIAS DO PRADO

**“AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE
(CGTase) POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE *Paenibacillus* sp.”**

SÃO CARLOS/SP

2014

**“AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE
(CGTase) POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE *Paenibacillus* sp.”**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

CLEITON DIAS DO PRADO

**“AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE
(CGTase) POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE *Paenibacillus* sp.”**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli
Co-orientador: Profa. Dra. Rosineide Gomes da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

SÃO CARLOS/SP

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P896ap Prado, Cleiton Dias do.
Avaliação da produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por fermentação submersa de *Paenibacillus* sp. / Cleiton Dias do Prado. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
91 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Engenharia bioquímica. 2. *Paenibacillus* sp. F37. 3. Ciclodextrinas. 4. β -CGTase. I. Título.

CDD: 660.63 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
CLEITON DIAS DO PRADO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS, EM 31 DE MARÇO DE 2014.

BANCA EXAMINADORA:



Paulo Waldir Tardioli
Orientador, UFSCar



Rosineide Gomes da Silva Cruz
Coorientadora, UFSCar



Lucy Seldin
UFRJ



Cristiane Sanchez Farinas
UFSCar



Teresa Cristina Zangirolami
UFSCar

Dedico este trabalho,

À Deus e a minha família por serem minha fortaleza e minha direção.

À vida, por de várias formas, mostrar o verdadeiro afrodisíaco que é viver.

AGRADECIMENTOS

Se pudesse em palavras expressar o quanto o SENHOR faz maravilhas em minha vida, tentaria escrever o mais belo texto, mas diante de sua imensidão e amor, só tenho a dizer de forma simples que, mais uma vez sua obra se cumpriu, e obrigado por me resgatar e mostrar o quanto tens um plano em minha vida, me entrego e que assim seja.

A minha família, aos meus pais José Carlos e Neusa por acreditarem em mim e por se doarem a cada momento de dificuldade, por me darem toda a base e estrutura familiar, e principalmente por me amarem, pois é em vocês que me encontro todo dia e me volto para mim mesmo e assim sei quem sou e sigo em frente.

Ser o filho mais novo me mostrou o quanto sou protegido. Hoje eu entendo que essa proteção foi para que eu não passasse pelo o que vocês passaram, e isso vocês lutaram e conseguiram. De certa forma muita coisa ainda está por vir, mas o que vocês já fizeram por mim, mesmo que de forma simples, eu jamais esquecerei, obrigado meus queridos irmãos Anderson, Cleberson e Emerson.

A lindeza e doçura chamada Antoniele Caldas.

Acreditar em um sonho que se sonha só, assim foram estes dois anos de mestrado. Existem momentos em que desacreditar nas pessoas é mais fácil do que acreditar, e assim o sonho vai se distanciando a cada dia. Por isso resolvi acreditar em duas pessoas, e a elas minha eterna gratidão por confiarem em mim, por serem pacientes e me passarem ensinamentos que levarei por toda vida. Com a finalização desta pesquisa só tenho agradecer e dizer o quanto vocês fizeram toda a diferença, me sinto como um filho e sou feliz, por ter como meus orientadores e amigos os queridos Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli e Profa. Dra. Rosineide Gomes da Silva Cruz.

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio José Gonçalves da Cruz e a Prof. Dra. Teresa Cristina Zangirolami pela contribuição dada neste trabalho.

Agradeço ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em especial a Profa. Dra. Lucy Seldin por gentilmente ceder às cepas de *Paenibacillus* sp. F20 e F37 para a realização desta pesquisa e também por sua importantíssima colaboração e participação na banca examinadora deste trabalho.

Agradeço a Universidade Federal de São Carlos pela infraestrutura e recursos disponíveis, a CAPES pela bolsa e recursos concedidos, aos professores do PPGEQ e a todos os profissionais envolvidos. Gostaria de deixar também meus agradecimentos aos técnicos de laboratório Amadeus, Thais, Aline e Thiago. E também as competentes secretárias do DEQ, Carol e Raquel, que de forma ímpar deixaram o seu significado neste degrau de minha vida, jamais me esquecerei de vocês.

Quem tem um amigo de verdade tem um tesouro, assim são vocês Adilson, Ana Carolina, Ana Maria Vélez, Amanda, Camila R, Cinthia, Cláudia, Dennis, Fabiane, Gabriela, Gilson, Gislene, Guilherme, Henrique, Jader, Jailson, Junior, Marco, Mayerlenis, Melissa, Patrícia, Priscila, Renato, Renata, Ruth e Tânia. Obrigado por estarem ao meu lado e por toda força e energia positiva dispensada, e claro a todos os momentos de descontração que foram convertidos em ânimo e foco. Agradeço também a todos os meus colegas de departamento que me ajudaram muito da forma que puderam, a vocês todo o meu carinho e respeito.

Toda superação tem a participação de pessoas que fazem toda a diferença, que bom que é estar perto de pessoas do bem, assim tudo fica mais fácil, à família Motricidade o meu muito obrigado, não só pelos amigos que fiz, mas por que vocês permaneceram para sempre neste capítulo de minha vida.

Por fim agradeço a mim mesmo, pelo crescimento pessoal, acadêmico e profissional, saber que acreditar em mim é o primeiro passo, e que a evolução é constante, e o mundo ainda está salvo, pois existem motivos para gozar deste mistério que se chama VIDA.

*Combati o bom combate, acabei
a carreira, guardei a fé.*

Timóteo 4-7

RESUMO

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos de grande importância comercial e que apresentam amplo emprego industrial nos setores farmacêutico, alimentício, de cosmético, dentre outros, por terem a capacidade de encapsulamento ao nível molecular de um grande número de moléculas orgânicas. CDs podem apresentar diversos tamanhos, sendo as que têm 6, 7 ou 8 unidades de glicose, denominadas α , β e γ -CD, respectivamente, são as mais conhecidas. Estas são obtidas a partir da hidrólise do amido pela ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase – EC 2.4.1.19). A CGTase geralmente é produzida por bactérias do gênero *Bacillus* e *Klebsiella pneumoniae*. Levando em consideração a importância comercial desta enzima e a busca por microrganismos produtores de CGTase que produzam predominantemente uma CD de interesse, esse trabalho buscou avaliar a produção de CGTase a partir de *Paenibacillus* sp. F37. Os experimentos tiveram como objetivo a avaliação do potencial de produção da enzima por esse microrganismo, bem como a caracterização e a classificação da enzima. A análise de atividade enzimática foi realizada pela atividade de ciclização do sobrenadante do meio de cultivo, que foi monitorada pela taxa de produção de β -CD a 50°C, pH 8,0, usando uma solução de dextrina como substrato. Avaliou-se inicialmente a influência do pH (6,0 a 10,0) no crescimento do microrganismo em meio Horikoshi sólido, sem amido. Observou-se melhor crescimento em pH 8,0, definindo-se esse valor para ensaios de crescimento em meio Horikoshi líquido, sem amido. Nessa etapa definiram-se as condições de crescimento como 10 h, 37°C e agitação de 120 rpm em câmara incubadora. A etapa de produção da CGTase foi realizada em meio Horikoshi com amido solúvel 1%, m/v (indutor da enzima), avaliando-se pH e tempo de cultivo. Sob condições padronizadas (37°C, 120 rpm, 16 h e meio de produção preparado em tampão tris-HCl 0,1 M, pH 9,0) atingiu-se uma atividade volumétrica no meio de produção da ordem de 800 U/L, correspondendo a uma produtividade de aproximadamente 50 U/L.h⁻¹. A caracterização da enzima bruta mostrou que a CGTase de *Paenibacillus* sp. F37 apresenta atividade máxima de ciclização em 50°C, pH 6,0. Nessas condições a enzima apresentou meia-vida aproximada de 2 h. Nas condições de cultivo (37°C, pH 9,0), a enzima apresentou baixa estabilidade, com meia-vida em torno de 3 h, sendo praticamente inativada em 5 h. Por isso, produzir a enzima em meio cujo pH inicial é 9,0 e esse reduz-se ao longo do cultivo para em torno de 6,0, mostrou-se uma boa estratégia para prevenir a desnaturação da enzima. A produção de CDs em reator batelada e a sua caracterização colorimétrica e por CLAE permitiram a classificação da enzima como uma β -CGTase (razão α -: β -: γ -CD de 0:1:0,26). Nas condições de produção

de CDs (50°C, pH 8,0, 50 g/L de dextrina, 1,6 U/g de dextrina e 92 h) atingiu-se uma produtividade de β -CD da ordem de 100 mg/L.h. Os resultados indicam, portanto, que *Paenibacillus* sp. F37 é um microrganismo promissor na produção de CGTase.

Palavras-chave: *Paenibacillus* sp. F37, Ciclodextrina glicosiltransferase, β -CGTase, Ciclodextrinas, β -CD.

ABSTRACT

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides that show the ability to encapsulate a large number of organic molecules at the molecular level. Thus, they have large application in pharmaceutical, food, and cosmetics industries. CDs may have different sizes; however the most common are formed by 6, 7, and 8 glucose units, called α , β and γ -CD, respectively. These compounds are produced from starch by hydrolysis catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase - EC 2.4.1.19) enzyme. CGTase is commonly produced from bacteria of the genus *Bacillus* and *Klebsiella pneumoniae*. Due to the commercial importance of this enzyme and of the microorganisms producing CGTase whose enzyme is capable to produce only one CD, this work aimed to evaluate the CGTase production by the bacterium *Paenibacillus* sp. F37. The experiments aimed to assess the potential for enzyme production by *Paenibacillus* sp. F37 strain and also the characterization and classification of the enzyme. Analysis of enzymatic activity was accomplished by cyclization activity of the supernatant of the culture medium, which was monitored by the production rate of β -CD at 50°C, pH 8.0 using a solution of dextrin as substrate. Initially it was evaluated the effect of the pH (6.0 to 10.0) over the microorganism growth into solid Horikoshi medium without starch. It was observed that the microorganism grew better at pH 8.0, being this pH adopted for assays using liquid Horikoshi medium without starch. In this step it was established the following conditions to the bacterium growth: 10h, 37°C, and agitation of 120 rpm in an incubator. The CGTase production step was performed into Horikoshi medium containing 1% (m/v) soluble starch (enzyme inducer), and pH and production time were evaluated. Under standard conditions (37°C, 120 rpm, 16h, and culture medium prepared in 0.1 M tris-HCl buffer pH 9.0) the volumetric activity from the culture medium achieved about 800 U/L, corresponding to a productivity of 50 U/L.h⁻¹. The characterization of the crude enzyme showed that the CGTase from *Paenibacillus* sp. F37 strain has maximum cyclization activity around 50°C and pH 6.0. Under these conditions the enzyme showed to have a half-life time around 2 h. At the growth conditions (37°C, pH 9.0), the enzyme show to have a half-life time around 3h, being almost inactivated around 5h. Thus, the enzyme production in a medium where pH starts at 9.0 and is decreased to around 6.0 during the growth showed to be a good strategy to prevent denaturation of the enzyme. The CD production into batch reactor and their characterization by colorimetric and chromatographic methods allowed classifying the enzyme as a β -CGTase (ratio α -: β -: γ -CD of 0:1:0.26). At the CD-production conditions (50°C, pH 8.0, 50 g/L of dextrin, 1.6 U/g of dextrin, and 92 h) it was achieved β -CD productivity around 100 mg/L.h.

These results showed that *Paenibacillus* sp. F37 strain is a promising microorganism for producing CGTase.

Keywords: *Paenibacillus* sp. F37 strain, Cyclodextrin glucanotransferase, β -CGTase, Cyclodextrins, β -CD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Representação esquemática das reações catalisadas pela enzima CGTase. a) ciclização; b) acoplamento; c) desproporcionalização; d)hidrólise.....	25
Figura 2.2 Representação das reações de ciclização (transglicosilação intramolecular).....	26
Figura 2.3 Estrutura das α -, β -, γ -ciclodextrinas com suas respectivas unidade de glicose.....	30
Figura 2.4 Aspecto da estrutural geral de um ciclodextrina.....	31
Figura 2.5 Representação química e estrutural da α -CD.....	31
Figura 2.6 Dimensões geométricas das CDs.....	33
Figura 2.7 Representação esquemática da formação do complexo de inclusão. O p-xileno é a molécula hóspede.....	35
Figura 3.1 Esquema representativo do sistema experimental da produção de ciclodextrinas .	42
Figura 3.2 Curva padrão de β -Ciclodextrina.....	44
Figura 3.3 Curva padrão de γ -CD.....	45
Figura 4.1 Crescimento em placa de <i>Paenibacillus</i> sp. F37. (a) pH 6,0; (b) pH 7,0; (c) pH 8,0; (d) pH 9,0 e (e) pH 10.....	53
Figura 4.2 Curva de crescimento celular do <i>Paenibacillus</i> sp. F37 em meio Horikoshi líquido a 37°C, pH 8,0 e 9,0, em termos de D.O. a 600 nm.....	54
Figura 4.3 Gráfico comparativo dos ensaios de produção de CGTase a partir de cultivo de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 (37°C, pH 8,0). A atividade volumétrica foi monitorada por medida de atividade ciclização (μ moles β -CD/min) a 50°C, pH 8,0, usando-se dextrina (1%, m/v) como substrato	56
Figura 4.4 Atividade enzimática de CGTase em cultivos de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 a 37°C e diferentes valores iniciais de pH.....	59
Figura 4.5 Produção de CGTase por fermentação submersa de <i>Paenibacillus</i> sp. cepas F20 e F37 a 37°C, 120 rpm e pH 8,0 (tampão tris-HCL 0,1 M), pH 9,0 (tampão tris-HCl 0,1 M) e pH 10,0 (tampão carbonato 0,1 M)	61
Figura 4.6 Influência da presença de amido solúvel na formulação do inóculo de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 e tempo de inoculação (37°C, pH 8,0) na produção de CGTase a 37°C, pH 9,0, 16 h de cultivo	63
Figura 4.7 Resultados de atividade enzimática dos ensaios de produção de CGTase por cultivo de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 a 37°C e nos pHs 9,0 e 11,0 livre e controlado	65

Figura 4.8 Atividade volumétrica de CGTase produzida por <i>Paenibacillus</i> sp. F37 a 50°C e diferentes valores de pH. Os tampões utilizados foram os seguintes: citrato 0,1 M, pH 5,0; fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 e 7,0; tris-HCl pH 8,0 e 9,0 e glicina/NaOH 0,1M, pH 10,0.	68
Figura 4.9 Atividade volumétrica de CGTase produzida por <i>Paenibacillus</i> sp. F37 a pH 6,0 e diferentes temperaturas. A enzima foi produzida em 37°C, pH 9,0, 120 rpm e 16 horas de cultivo	69
Figura 4.10 Estabilidade de CGTase de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 a 50°C, pH 6,0. A atividade inicial de ciclização (formação de β -CD) foi considerada 100%	70
Figura 4.11 Estabilidade de CGTase de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 a 37°C, pH 9,0. A atividade inicial de ciclização (formação de β -CD) foi considerada 100%	71
Figura 4.12 Cultivo de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 a 37°C 120 rpm, pH 6,0 (tampão citrato 0,5M), pH 7,0 e 8,0 (tampão tris-HCl 0,5M), pH 8,0 e 9,0 (tampão carbonato de sódio 0,5M), pH 10,0 (1% de Na ₂ CO ₃) e pH 11,0 (Glicina/NaOH 0,5M), 16h de cultivo	72
Figura 4.13 Produção de CGTase por cultivo de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 a 37°C, 120 rpm, tampão tris-HCl (0,1 M e 0,5 M) pH 9,0, 24 h, inoculação do meio com criotubos novos ..	73
Figura 4.14 Produção de CGTase por cultivo de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 a 37°C, 120 rpm, tampão tris-HCl (0,1 M e 0,5 M) pH 9,0, 24 h, inoculação do meio com criotubos velhos .	74
Figura 4.15 Produção de CDs a 50°C, usando como substrato solução de dextrina 50 g/L, preparada em tampão tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, 92 h de reação, 10 mL de extrato enzimático (~ 800 U/L), razão enzima/substrato ~ 1,6 U/g	76
Figura 4.16 Cromatogramas de padrões de CDs (α -, β -, e γ -CD, 2g/L), maltose e glicose (2g/L) obtidos por CLAE. Coluna Sugar KS-802 (7 μ m, 8 ID x 300 mm), 80°C, fase móvel água 1 mL/min, detector IR, 45°C	77
Figura 4.17 Cromatogramas (duplicata) da amostra final (92 h) de produção de CDs após tratamento com AMG (1h, 60°C) obtido por CLAE, usando coluna Sugar KS-802 (7 μ m, 8 ID x 300 mm), 80°C, fase móvel água 1 mL/min, detector IR, 45°C	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Algumas propriedades das CGTases produzidas por diversos microrganismos....	23
Tabela 2.2 Propriedades físico-químicas das principais ciclodextrinas.....	33
Tabela 2.3 Principais fármacos comerciais complexados com CDs	37
Tabela 2.4 Resumo das principais vantagens e aplicações das ciclodextrinas.....	38
Tabela 3.1 Composição do meio TSB ágar usado para a reativação do <i>Paenibacillus</i>	48
Tabela 3.2 Meio Horikoshi da etapa de pré-inóculo, inóculo e produção	48
Tabela 4.1 Comparação do tempo de produção de CGTase por cultivo de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 a 37°C, pH 8,0	57
Tabela 4.2 Valores de pH, inicial e final, em cultivos de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 a 37°C.....	59
Tabela 4.3 Atividade volumétrica de CGTase e concentração celular do inóculo e meio de produção de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 a 37°C, pH 9,0, 16 h. Concentração celular é expressa em termos de D. O. em 600 nm.....	63
Tabela 4.4 Valores de pH dos tempos de cultivo de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 a 37°C com ajuste inicial de pH e tamponamento do meio de produção usando tampão tris-HCl 0,1M pH 9,0, tampão Glicina/NaOH 0,1 M pH 11,0.....	66
Tabela 4.5 Valores de atividade enzimáticas (expressas em $\mu\text{moles } \beta\text{-CD}/\text{min}$) para a produção de CGTase a partir de diferentes linhagens	67
Tabela 4.6 Valores de pH (inicial e final) e atividade (volumétrica e específica) de CGTase e concentração celular do meio de produção de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 a 37°C, em diferentes pHs, 16 h.....	72
Tabela 4.7 Atividades volumétricas (U/L) e produtividades (U/L.h ⁻¹) de CGTase produzida por <i>Paenibacillus</i> sp. F37 a 37°C, pH 9,0*, 16 h, 120 rpm.....	75

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 CGTase.....	21
2.1.1 Produção de CGTase	21
2.1.2 Mecanismo de ação e estrutura molecular da CGTase	25
2.2 Purificação da enzima CGTase.....	27
2.3 Ciclodextrina	28
2.3.1 Dados históricos das ciclodextrinas	28
2.4 Características e propriedades das ciclodextrinas	29
2.5 Inclusão molecular	34
2.6 Aplicações das Ciclodextrinas.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Materiais	40
3.1.1 Reagentes analíticos	40
3.1.2 Microrganismo	40
3.1.3 Extrato enzimático	40
3.1.4 Substrato Enzimático.....	40
3.1.5 Ciclodextrina padrão	40
3.1.6 Reatores e Equipamentos	40
3.1.6.1 Reator.....	41

3.1.6.2 Principais equipamentos.....	41
3.2 Métodos Analíticos.....	41
3.2.1 Determinação da atividade enzimática	41
3.2.2 Dosagem de ciclodextrinas	43
3.2.2.1 Dosagem colorimétrica de β -CD.....	43
3.2.2.2 Dosagem colorimétrica de γ -CD.....	44
3.2.2.3 Caracterização cromatográfica de α -CD, β -CD e γ -CD	46
3.2.3 Medida de densidade ótica do crescimento celular (DO).....	46
3.2.4 Medidas de massa seca (MS).....	46
3.3 Procedimento experimental	47
3.3.1 Reativação e pré inóculo das cepas.....	47
3.3.2 Inóculo e produção de CGTase.....	48
3.3.3 Caracterização físico-química da enzima bruta.....	49
3.3.3.1 pH ótimo	49
3.3.3.2 Temperatura ótima	50
3.3.3.3 Estabilidade Térmica.....	50
3.3.4 Ensaios de produção de ciclodextrinas.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Ensaios de crescimento da cepa F37 em placa com diferentes valores de pH.....	52
4.2 Curva de crescimento da estirpe <i>Paenibacillus</i> sp. F37.....	53
4.3 Cultivo a partir de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 conservado em placas e criotubos....	55
4.4 Cultivo submerso em diferentes valores de pH.....	58
4.5 Cultivo de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 para as cepas F20 e F37 em meio tamponado	60

4.6 Cultivo de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 a partir de inóculo com e sem amido em diferentes tempos de crescimento celular	62
4.7 Cultivo de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 em pH 9,0 e 11,0 em meio tamponado.....	64
4.8 Caracterização físico-química da enzima bruta.....	67
4.8.1 pH ótimo	68
4.8.2 Temperatura ótima.....	69
4.8.3 Estabilidade térmica da enzima bruta	70
4.8.4 Cultivo de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 em pH tamponado.....	71
4.8.5 Cultivo de <i>Paenibacillus</i> sp. F37 em pH variável e controlado	72
4.8.6 Quantificação de α -CD, β -CD e γ -CD	75
5 CONCLUSÃO	80
6 PERSPECTIVAS PARA PESQUISAS FUTURAS	82
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a utilização de enzimas nos diferentes segmentos indústrias tem se intensificado devido ao interesse em se obter produtos de maior valor econômico. O mercado mundial de enzimas girou em torno de US\$ 3,7 bilhões em 2010, contra US\$ 2 bilhões em 2002 (BCCR, 2011). A substituição de catalisadores químicos em processos industriais por enzimas, deve-se principalmente às condições brandas de pH e temperatura em que estas moléculas atuam, sendo que dentre as enzimas mundialmente comercializadas merecem destaque as proteases, celulasas, lipases e amilases.

As amilases são enzimas que atuam sobre o amido, polímero formado por unidades de glicose unidas entre si por ligações α -glicosídicas e é o produto de reserva de muitas plantas economicamente importantes como trigo, arroz, milho, mandioca e batata. O amido é formado por duas frações distintas: amilose e amilopectina. A amilose é um polímero linear de unidades de glicose unidas por ligações α -1,4-glicosídicas e a amilopectina é um polímero ramificado de unidades de glicose unidas por ligações α -1,6-glicosídicas (MACHOVIC; JANECEK, 2007).

Devido à ampla utilização do amido na indústria, as amilases encontram-se entre as enzimas mais utilizadas com finalidades industriais, chegando a 30% do uso total de enzimas no mundo. Assim, várias tecnologias têm sido desenvolvidas, relacionadas às etapas de produção, extração, e purificação. Dessa forma existe uma intensa busca pelo desenvolvimento de novos processos e microrganismos com elevados níveis de expressão dessas enzimas visando à viabilidade econômica de tais tecnologias.

Com base em similaridades e diferenças de suas estruturas primárias, as amilases são classificadas em famílias de glicosil hidrolases (GH), a saber: α -amilases (GH13), β -amilases (GH14) e glicoamilases (GH15). A família GH13 contém quase 30 enzimas com diferentes especificidades, classificadas em GH13, GH70 e GH77, as quais juntas formam o grupo GH-H. Pertence a esse grupo a enzima ciclodextrina glicosiltransferase, um membro da família GH13 (MACHOVIC; JANECEK, 2007; KUO *et al.*, 2009).

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase – EC 2.4.1.19) é uma enzima com atividade hidrolítica sobre o amido, apresentando também atividade de ciclização sobre polímeros de glicose, formando ciclodextrinas (CDs) de diferentes tamanhos. As CDs mais comuns são constituídas por 6, 7 e 8 unidades de glicose, sendo denominadas α -ciclodextrina

(α -CD), β -ciclodextrina (β -CD) e γ -ciclodextrina (γ -CD), respectivamente (FRÖMMING; SZJETLI, 1994; BEKERS *et al.*, 1991; TARDIOLI *et al.*, 2000).

CDs são oligossacarídeos cíclicos formados por unidades de glicose unidas por ligações α -1,4-glicosídicas que formam complexos com uma ampla variedade de moléculas orgânicas e inorgânicas devido ao caráter hidrofóbico de sua cavidade interna, conferindo à molécula complexada propriedades físico-químicas diferentes, tais como, maior resistência química, maior solubilidade e menor volatilidade (SZJETLI, 1990; TARDIOLI *et al.*, 2006).

Essas propriedades têm criado aplicações das CDs com um grande valor comercial em indústrias farmacêuticas, alimentícias, de cosméticos, agroindustriais, dentre outras, com principal uso no encapsulamento de substâncias, visando uma maior estabilidade dos produtos, bem como o aumento da solubilidade de compostos (KITAYSKA *et al.*, 2011). Muitos países têm aprovada a utilização de CDs ou derivados de CDs em alguns produtos, tais como: Voltaren oftálmico (complexo diclofenaco sódico/hidroxipropil γ -CD), Flogene (complexo Piroxicam/ β -CD), Nicorette (complexo nicotina/ β -CD), gomas de mascar, xampus, etc (LOFTSSON; MASSON, 2001; SZEJTLI, 2004).

A capacidade de inclusão molecular das CDs depende do tamanho de suas cavidades hidrofóbicas. A α -CD tem a menor cavidade, não sendo adequada para inclusão da maior parte dos princípios ativos (BEKERS *et al.*, 1991). A γ -CD possui a maior cavidade, sendo adequada para a inclusão de moléculas que não são encapsuladas pela α - e β -CD. Entretanto, a β -CD é mais utilizada industrialmente devido ao seu menor custo de produção quanto comparado às outras CDs. Esta ciclodextrina é a menos solúvel em água, podendo ser facilmente cristalizada.

A enzima CGTase geralmente é obtida por várias bactérias do gênero *Bacillus* e *Klebsiella pneumoniae*, apresentando diferentes propriedades catalíticas, tais como, pH e temperatura ótimos, estabilidade térmica e o tipo de CD produzida. Normalmente, a CGTase catalisa a produção de uma mistura de CDs, sendo uma delas produzidas majoritariamente e de acordo com a CD produzida em maior quantidade, as CGTases são classificadas em α -CGTase, β -CGTase, e γ -CGTase.

Sabioni e Park (1992), reportaram que linhagens da espécie *Paenibacillus macerans* e *Bacillus alcalofílico* n^o 38-2 são produtoras de α -CGTase (razão α : β : γ de CDs produzidas igual a 2,7:1:1) e β -CGTase (razão α : β : γ de CDs produzidas igual a 1:11:1,5),

respectivamente. As γ -CGTases são pouco estudadas e caracterizadas, tornando seu mercado muito pequeno devido ao seu baixo volume de produção e ao alto preço da ciclodextrina (KITAYSKA *et al.*, 2011).

O custo de purificação de uma CD de interesse a partir de uma mistura de CDs é alto e muitas vezes requer o uso de solventes tóxicos. Portanto, a busca por microrganismos produtores de CGTases que produzam predominantemente uma CD de interesse é constante e tem grande relevância do ponto de vista industrial.

Poucos trabalhos são reportados na literatura referente à produção de CGTase por bactérias do gênero *Paenibacillus* (YENPETCH *et al.*, 2006; CHAROENSAKDI, *et al.*, 2007; KAULPIBOON *et al.*, 2010). A produção e caracterização de CGTase por *Paenibacillus* sp. F8 foi descrita por Larsen *et al.*, (1998), os quais verificaram que o pH e a temperatura ótimos para a atividade de ciclização era de 7,5 e 50°C, respectivamente; o pH e a temperatura ótimos para a hidrólise era de 8,0 e 60°C, respectivamente. A massa molecular da enzima foi estimada em 72 kDa por SDS-PAGE.

Neste contexto, a proposta deste trabalho de mestrado foi investigar o potencial de produção de CGTase a partir de fermentação submersa de *Paenibacillus* sp. F37, isolada do solo de Cerrado e Várzea por pesquisadores do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (UFRJ, Rio de Janeiro), e gentilmente doadas ao DEQ/UFSCar pela Profa. Dra. Lucy Seldin.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CGTase

Ciclodextrina glicosiltransferase (1,4- α -D-glicopiranosiltransferase; EC 2.4.1.19; CGTase) é uma enzima que catalisa a produção de ciclodextrinas (CDs) a partir de amido ou substratos similares (glicogênio, maltodextrinas, etc) por meio de uma reação de ciclização (KATO; HORIKOSHI, 1986; SJEJTLI, 1988; TARDIOLI *et al.*, 2006; KITAYSKA *et al.*, 2011).

CGTase é geralmente uma enzima extracelular produzida por várias bactérias, como por exemplo, as do gênero *Bacillus* (NAKAMURA; HORIKOSHI, 1977; KATO; HORIKOSHI, 1986; NORMAN; JORGENSEN, 1992; HORIKOSHI, 1996; MATIOLI *et al.*, 1998; MENOCCI *et al.*, 2008; MORIWAKI *et al.*, 2009; KUO *et al.*, 2009; KITAYSKA *et al.*, 2011; ELBAZ *et al.*, 2014; USHARANI *et al.*, 2014), *Klebsiella pneumoniae* (GAWANDE *et al.*, 2001), *Stenotrophomonas maltophilia* (WRZESESINKI, 2013), e *Thermoanaerobacter* sp. (STARNES *et al.*, 1990; TAI *et al.*, 2013; MATHEWS; ADLERCREUTZ, 2013).

A CGTase é uma enzima monomérica, com massa molecular da ordem de 70-75 KDa e apresenta uma sequência de aproximadamente 700 aminoácidos, conferindo a ela similaridade estrutural com a enzima α -amilase, sendo por isso considerada um enzima da família das amilases (SCHIMID, 1989; KANEKO *et al.*, 1990; NAKAMURA *et al.*, 1994).

2.1.1 Produção de CGTase

É explícito o aumento da utilização de enzimas para a produção industrial, uma vez que a cada dia novas enzimas estão sendo descobertas graças o trabalho em conjunto de equipes multidisciplinares da Microbiologia, Química, Bioquímica, Engenharia bioquímica, entre outras, fazendo com que a utilização de enzimas aumente, movimentando bilhões de dólares (SANT'ANNA JUNIOR, 2001; VINIEGRA-GONZÁLEZ *et al.*, 2003; ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Segundo Szejli (1998), o primeiro microrganismo descrito na literatura como produtor de CGTase foi o *Bacillus amylobacter* estudado por Villiers em 1891, porém foi somente em 1939 que Shardingier descreveu o *Bacillus macerans* como um bom produtor de CGTase.

Desde a descoberta de um microrganismo bom produtor de CGTase em 1939, a produção dessa enzima tem sido estudada a partir de diversas espécies de bactérias, tais como *Bacillus megaterium*, *Bacillus macerans*, *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus stearothermophilus* (HORIKOSHI, 1988). Pioneiro nos estudos com CGTase, Horikoshi (1988) começou a pesquisar a produção de CGTases a partir de microrganismos acalofílicos. Uma das bactérias estudadas produziu preferencialmente β -CD em quantidades superiores às CGTases reportadas na literatura, passando a ser essa linhagem estudada em uma série de trabalhos e considerada como a melhor produtora de CGTase para aquela época.

São reportadas também técnicas de produção de CGTase com células imobilizadas, tais como, produção de CGTase de *Bacillus cereus* NCMI 13123 (JAMUNA *et al.*, 1993), *Bacillus circulans* 21783 (SASWATHI *et al.*, 1995) e *Bacillus amyloliquefaciens* (ABDEL-NABY *et al.*, 2000) imobilizadas em alginato. Vassileva *et al.* (2005) reportaram a produção de CGTase de *Bacillus circulans* 21783 encapsuladas em ágar ou imobilizadas em reator de membrana. Embora a produção com células imobilizadas tenha sido menor em relação à produção com células livres, a atividade volumétrica e a produtividade foram maiores comparadas àquelas obtidas com outras linhagens de *Bacillus*.

CGTases obtidas a partir de diferentes linhagens apresentam diferentes características e propriedades catalíticas, tais como estabilidade térmica, pH ótimo, massa molecular e tipo de CD produzida majoritariamente (HORIKOSHI, 1988; MORIWAKI *et al.*, 2007). Santos *et al.*, 2013 através de *Bacillus firmus* cepa 37 isolado do solo brasileiro, obteve em seu estudo uma maior atividade enzimática em testes de precipitação, parâmetro também observado em estudos realizados por Matioli *et al.*, 1998.

Do ponto de vista industrial muitas CGTases apresentam baixa estabilidade térmica e rendimento em torno de 55%, o que acaba se tornando um fator limitante para produção de CDs em grande escala (HORIKOSHI, 1988; BEKERS *et al.*, 1991; TARDIOLI, 1998). Com isso, as pesquisas se direcionaram na busca por CGTases termoestáveis e com maior rendimento na produção de CDs. Na tabela 2.1 são apresentadas algumas linhagens de microrganismo produtores de CGTase e suas propriedades.

Tabela 2.1 – Algumas propriedades das CGTases produzidas por diversos microrganismos.

Microrganismo	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Massa molecular (kDa)	Referências
<i>Bacillus lentus</i>	10,5	ND	ND	GAWANDE <i>et al.</i> ,
<i>Bacillus firmus</i>	5,5-8,5	65	78(SDS-PAGE)	1999
	7-11	10	82(Gel de filtração)	
	7	60		
<i>Bacillus</i> sp.	6,6	65	68	THATAI <i>et al.</i> , 1999
<i>Thermoanaerobacter</i>	7,0-8,0	80	ND	AYSE; SEDAT. 2009
<i>Paenibacillus</i> sp. F8	7,5-8	50-60	72	LARSEN <i>et al.</i> , 1998
<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	6	90-95	ND	NORMAN; JORGENSEN, 1992; PEDERSEN <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacillus</i> sp. S-6	7,0- 6,0-10,0	40 >45	ND	JUN <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus agaradharens</i> LS-3C	9,0	55	110/112	MARTINS; HATTIKAUL, 2002.
<i>Bacillus clarkii</i> 7364	5,5-5,8	60	75	BOVETTO <i>et al.</i> , 1992
<i>Bacillus firmus</i>	5,5-8,5	60	ND	HIGUTI <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus</i> sp.	9,0	45	ND	USHARANI <i>et al.</i> , 2014
<i>Bacillus lehensis</i>	8,0	55	82	BLANCO <i>et al.</i> , 2014

Fonte: Adaptado de CUCOLO, 2009; AGUIAR, 2001.

CGTases são geralmente secretadas no meio de cultura, embora atividade intracelular de CGTase tem sido reportada (LASZLÓ, 1981; MATIOLI, 2000 GAWANDE *et al.*, 2003). Muitos microrganismos produzem a enzima na fase exponencial do crescimento e a secretam na fase estacionária. Por exemplo, Mäkelä *et al.* (1988) estudando uma linhagem do gênero *Bacillus circulans* observaram que 65% da produção da enzima ocorreu na transição entre as fases exponencial e estacionária do crescimento microbiano, sendo que a produção aumentou 20% na fase estacionária e o restante foi liberado na fase de morte celular, devido a liberação da CGTase intracelular.

As CGTases são classificadas de acordo com o principal tipo de CD produzida. As α -CGTase e β -CGTase produzirem majoritariamente nos instantes iniciais de reação α -CD e β -CD, respectivamente. Poucas bactérias pertencem a um terceiro grupo, cujo produto principal da reação é a γ -CD, sendo as espécies pertencentes a este grupo classificadas como γ -CGTase,

o tamanho das CDs obtidas é altamente dependente de fatores e parâmetros que vão além do tipo de CGTase obtida, (QI e ZIMMERMANN, 2005; GOH *et al.*, 2009).

Segundo Szejtli (1988) *Bacillus macerans* e *K. pneumoniae* produzem preferencialmente α -CD, enquanto bactérias alcalofílicas produzem preferencialmente β -CD no início da reação. Sabioni e Park (1992) reportam que *Bacillus macerans* é uma produtora de α -CGTase na razão de CDs $\alpha:\beta:\gamma$ de 2,7:1:1. *Bacillus* alcalofílico n.º.38-2 e *Bacillus lentus* são produtoras de β -CGTase nas razões de CDs $\alpha:\beta:\gamma$ de 1:11:1,5 e 1:67:1,6, respectivamente. Yim *et al.* (1997) identificaram uma linhagem do gênero *Bacillus firmus* n.º. 324 produtora de β -CGTase na razão de CDs $\alpha:\beta:\gamma$ de 1:11:5.

Técnicas de Engenharia Genética tem sido aplicadas no desenvolvimento de microrganismos mutantes específicos na produção de um tipo particular de CD (PEDERSEN *et al.*, 1995; QI, ZIMMERMANN, 2005). Por exemplo, microrganismos hospedeiros como *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis* são bons produtores de enzimas, sendo utilizados na clonagem e expressão de genes para a produção em grande escala de uma enzima de interesse industrial. Além disso, também podem aumentar o rendimento da enzima e simplificar a purificação caso o hospedeiro secrete somente CGTase ativa (SCHMID, 1989).

A temperatura e o pH são os parâmetros físicos que mais influenciam na produção da CGTase, porém a produção da enzima também é dependente da fonte de carbono (PINTO *et al.*, 2007). Linhagens do gênero *B. circulans* crescem tanto em meio com glicose quanto com amido, porém atividade só é detectada quando se utiliza amido (PINTO *et al.*, 2007). Gawande *et al.* (1999) testaram diferentes fontes de carbono para uma cultura de *B. firmus* e observaram que esse microrganismo crescia bem em quase todas as fontes de carbono, porém atividade de CGTase era expressa apenas quando havia a presença de amido no meio. *Bacillus cereus* NCIMB 13123 são capazes de sintetizar CGTase a partir de outras fontes de carbono, como glicose e xilose (JAMUNA *et al.*, 1993). No entanto, é importante ressaltar que a formação de CGTase apesar de ser dependente da presença do amido é inibida pela glicose (QI; ZIMMERMANN, 2005).

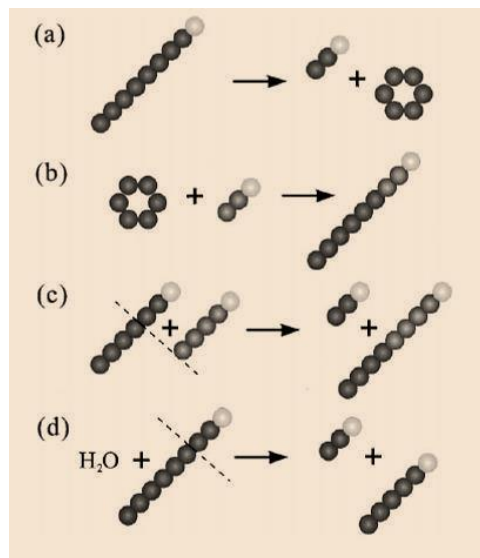
Geralmente os meios de cultura para a produção de CGTase são compostos de amido como fonte de carbono, fonte de nitrogênio e de vitaminas. Segundo MATIOLI (2000), devido à complexidade dos meios de cultivo, diversos tipos de amido são utilizados como substrato, como por exemplo, amido de milho, batata, mandioca, trigo e arroz. As fontes de proteína geralmente são peptona, extrato de carne e levedura, farinha de soja, até mesmo água

de maceração de milho. Os sais minerais mais usados são K_2HPO_4 , $MgSO_2$, $CaCl_2$, Na_2CO_3 e $CaCO_3$.

2.1.2 Mecanismo de ação e estrutura molecular da CGTase.

CGTase é uma enzima muito complexa e atualmente são conhecidos quatro tipos de reações catalisadas por essa enzima: ciclização, acoplamento, desproporcionamento e hidrólise (Figura 2.1) (BENDER, 1986; MATIOLI *et al.*, 2000; VASSILEVA *et al.*, 2005).

Figura 2.1 – Representação esquemática das reações catalisadas pela enzima CGTase. a) ciclização; b) acoplamento; c) desproporcionamento; d) hidrólise.



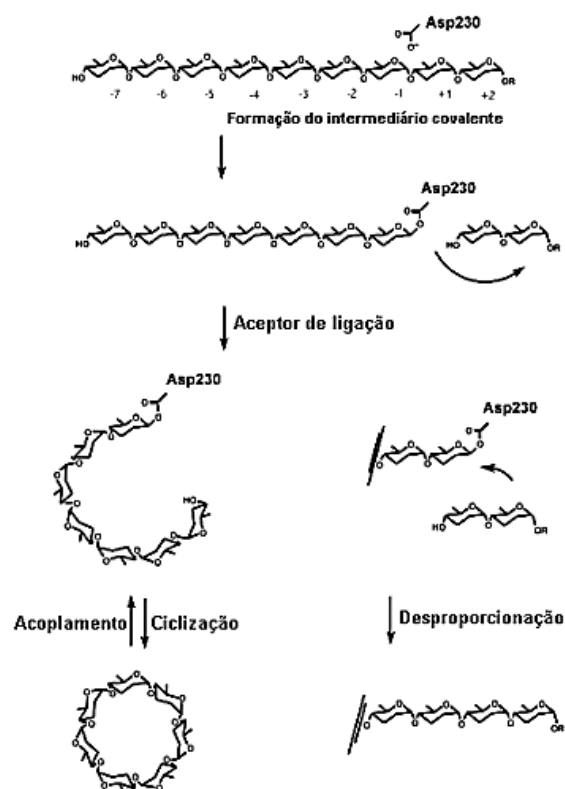
Fonte: Adaptado de PINTO, 2007. As esferas representam resíduos de glicose, e os círculos claros indicam os finais redutores dos açúcares.

A reação de ciclização ou transglicosilação intramolecular é responsável pela formação de CDs. Nesta reação, o substrato deve conter acima de seis unidades de glicose, e ainda estar na sua forma helicoidal (BENDER, 1986; MATIOLI *et al.*, 2000). A Figura 2.2 mostra esquematicamente a reação de formação de uma β -CD (7 unidades de glicose), a qual é assistida pelo resíduo Asp230 do sítio ativo da enzima. Um oligossacarídeo linear de nove unidades de glicose é clivado, e o oligossacarídeo linear de sete unidades de glicose liga-se

covalentemente ao resíduo Asp230, que posteriormente promove a ligação do terminal redutor ao não redutor deste oligossacarídeo, liberando a molécula de CD (neste caso de uma β -CD) (UITDEHAAG *et al.*, 2002; PINTO, 2007).

A reação de ciclização pode produzir uma mistura de CDs (α , β e/ou γ -CD), cuja proporção pode variar dependendo da origem da CGTase, do tempo e das condições de reação (GOH *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2006; ALVES-PRADO *et al.*, 2008).

Figura 2.2 – Representação das reações de ciclização (transglicosilação intramolecular)



Fonte: LEEHMHUIS *et al.*, 2003; CUCOLO, 2009.

A reação de acoplamento é a reação inversa à ciclização, ou seja, o anel da CD é clivado e transferido para um substrato aceptor (um maltooligossacarídeo). A reação de desproporcionamento ocorre quando um maltooligossacarídeo linear é clivado e um novo maltooligossacarídeo com final redutor é transferido para um substrato aceptor. A reação de hidrólise (quebra das ligações α -1,4-glicosídicas) ocorre a uma velocidade muito baixa (VAN DER VEEN *et al.*, 2000; PINTO, 2007).

As CGTases estão sujeitas à inibição por CDs. Neste contexto, a disponibilidade de uma CGTase capaz de produzir um tipo específico de CD a uma taxa elevada e com reduzida inibição pelo produto é de grande importância, pois a separação e purificação de um tipo particular de CD aumenta o custo de produção (RAHMAN *et al.*, 2006; BONILHA *et al.*, 2006).

2.2 Purificação da enzima CGTase.

CGTase produzida extracelularmente, principalmente por microrganismos do gênero *Bacillus*, deve ser isolada do meio de cultivo por separação das células por centrifugação, seguida de concentração por precipitação da enzima com solventes orgânicos (etanol e acetona, por exemplo) ou sais (sulfato de amônio, por exemplo), ou ainda concentração por ultrafiltração (PINTO *et al.*, 2007; BONILHA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2009; HERMES 2010; BENDER, 1986; CUCOLO, 2009).

Para a etapa de purificação são utilizadas as propriedades das proteínas, tais como, carga elétrica, tamanho e solubilidade. As técnicas de purificação mais utilizadas são cromatografia de troca iônica, gel filtração e afinidade. Muitas vezes são necessárias etapas como precipitação seletiva das proteínas com sais, ácidos ou temperaturas elevadas (SCOPES, 1994).

Uma das técnicas utilizadas para a purificação de CGTase é a precipitação por afinidade, utilizando amido como adsorvente (ROSSO *et al.*, 2005; MARTINS; HATTI-KAUL, 2002). Cromatografia de afinidade, utilizando amido como fase estacionária também tem sido utilizada. Entretanto, os resultados obtidos com essa técnica não são satisfatórios, necessitando etapas subsequentes para melhorar o fator de purificação e a atividade específica da enzima (GAWANDE *et al.*, 1999). Kitahata e Okada (1974) purificaram CGTse de uma linhagem de *Bacillus megaterium* por precipitação fracionada com sulfato de amônio, adsorção em amido, cromatografia de troca iônica em DEAE celulose e cromatografia de exclusão em Sephadex G-75, obtendo 50% de rendimento e fator de purificação de 130.

Dentre os diferentes tipos de cromatografia, as mais utilizadas são: cromatografia de afinidade (Sephacryl S-200; Sephadex G-50) (GAWANDE *et al.*, 1999; ALVES-PRADO *et al.*, 2007), cromatografia de interação hidrofóbica (Phenyl-Sephacryl) (JEMLI *et al.*, 2007) e por troca iônica (DEAE-

Cellulose; Q-Sepharose) (CHAROENSAKDI *et al.*, 2007; ALVES- PRADO *et al.*, 2007). Savergave *et al.*, (2008) purificaram uma CGTase de *Bacillus firmus* usando DEAE-Sepharose e obtiveram um fator de purificação de aproximadamente 23 vezes, com 80% de recuperação.

A purificação de enzima por cromatografia de afinidade bioespecífica é 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 α , β ou γ -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 a vantagem de fornecerem um grau de especificidade extremamente elevado e, portanto uma pureza elevada no produto proporciona uma separação rápida e geralmente em uma única etapa e, ainda possibilitam resultados de rendimento em proteína também elevado, uma vez que é protegida da desnaturação por estabilização da estrutura terciária (BERNA, 1990).

2.3 Ciclodextrina

A degradação enzimática do amido com a enzima α -amilase gera glicose, maltose, maltotriose e uma série de maltooligossacarídeos lineares ou ramificados, conhecidos como maltodextrinas, ou simplesmente dextrinas. A degradação do amido pela enzima CGTase submete as dextrinas à uma reação intramolecular, sem a participação da água, resultando na formação de produtos cíclicos, conhecidos como ciclodextrinas (CDs) (FRÖMMING; SZEJTLI, 1994).

2.3.1 Dados históricos das CDs

Villiers é considerado o primeiro pesquisador a relatar a existência de CDs, ao isolar em 1891 uma pequena quantidade de uma substância cristalina a partir de um meio de cultura de *Bacillus amylobacter* contendo amido, denominando essa substância de “celulosina”, devido a sua aparência com a celulose (SZEJTLI, 1988).

Alguns anos depois (1903 e 1911) Schardinger caracterizou a substância cristalina como uma mistura de dois oligossacarídeos cíclicos denominados dextrina cristalina α e dextrina cristalina β , sendo por esse motivo que as CDs também são conhecidas como

dextrinas de Schardinger (DUCHÊNE *et al.*, 1984). Após anos de pesquisa não muito positivas, no início dos anos 70 Freudenberg e seu grupo estudaram as propriedades de formação de complexos e assim foram caracterizadas diversas enzimas e preparados vários derivados. A massa molecular e o número de unidades de glicose de α e β - CD já tinham sido determinados anos antes por French & Rundle (1942) e da γ -CD por Freudenberg e Cramer (LIMA, 1996).

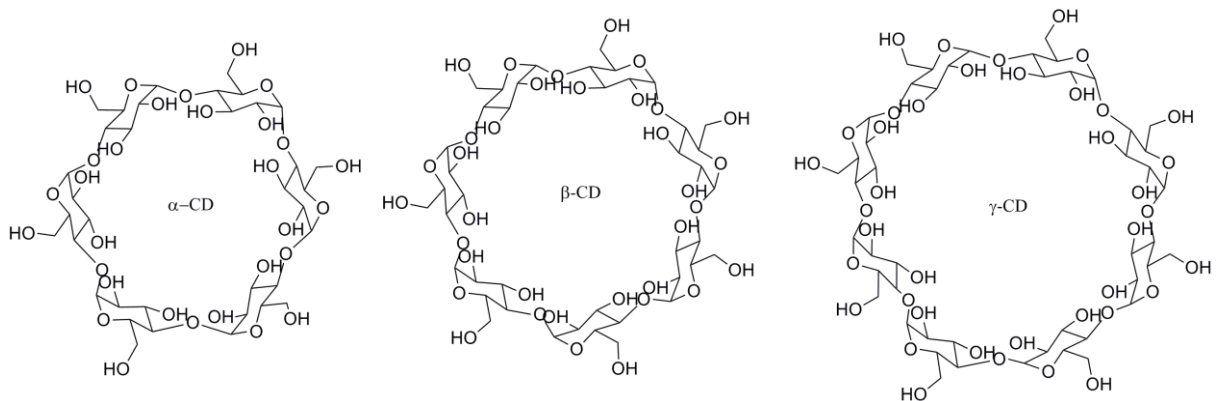
Na década de 70, com a publicação de artigos e depósitos de patentes sobre estudos toxicológicos de CDs, quebram-se as barreiras que impediam as aplicações das CDs nas indústrias farmacêuticas, de alimentos, química e outras (SZEJTLI, 1988). Na mesma década, um processo de obtenção de CDs com baixo custo utilizando CGTase de *Bacillus 38-2 alcalofílico* foi proposto por Horikoshi (1979), e como resultado foram desenvolvidos processos de produção de CDs em escala industrial.

Segundo Pszczola 1988, citado por Matioli (1997), em 1977, uma empresa japonesa iniciou a produção de CD em escala industrial, sob a denominação de Celdex, utilizando o método proposto por Horikoshi com a CGTase do *Bacillus sp. alcalofílico*. A produção industrial de CD no Japão atingiu então 600 toneladas/ano, com maior parte do produto destinado à indústria de alimentos.

2.4 Características e propriedades das CDs

As ciclodextrinas (CDs, cicloamilose, ciclomaltose, dextrinas de Schardinger) são oligossacarídeos cíclicos constituídos por um número variável de unidades de D-glicose unidas por ligações $\alpha(1,4)$. As mais comuns contém 6, 7 e 8 unidades de glicose, sendo denominadas de α -, β - e γ - CD, respectivamente (TONKOVA, 1998). A Figura 2.3 mostra a estrutura dessas três CDs.

Figura 2.3 – Estrutura das α -, β -, γ -CDs com suas respectivas unidade de glicose.



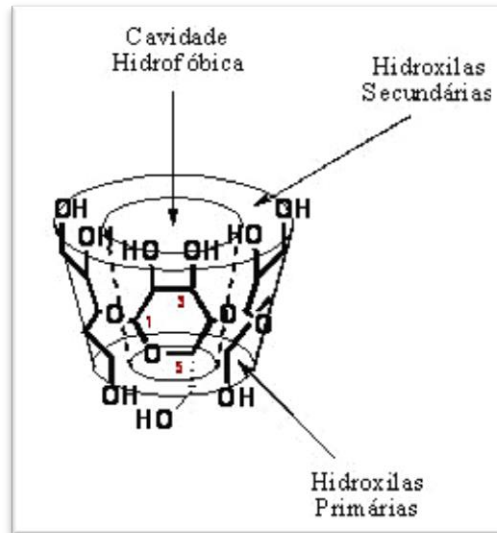
Fonte: OLSSON e WESTMAN, 2013.

Existem CDs maiores, contendo nove ou mais unidades de glicose, mas são difíceis de serem purificadas e apresentam pouca habilidade de complexação. Devido a sua pouca utilizada prática, não são produzidas industrialmente (BEKERS *et al.*, 1991; FRÖMMING; SZEJTLI, 1994; SZEJTLI, 1998). Larsen e Zimmermann (1999) purificaram e caracterizaram CDs com 9 a 19 unidades de glicose. Segundo Sundararajan e Rao (1970), através de um estudo de mapeamento de conformação energética, CDs com menos de 6 unidades de glicose não podem ser formadas por razões estéricas.

As CDs são substâncias não redutoras, higroscópicas e homogêneas, mas formam muitos hidratos estáveis (KOROLKOVAS, 1991; FRÖMMING; SZJETLI, 1994).

As CDs não são moléculas perfeitamente cilíndricas, elas apresentam a forma de um cone truncado como apresentado na Figura 2.4. As CDs possuem essa estrutura devido às hidroxilas secundárias (C2 e C3 das unidades de glicose) estarem situadas de um lado do anel e todas as hidroxilas primárias (C6 das unidades de glicose) estarem do outro lado do anel, como mostra a figura 2.5. As hidroxilas secundárias apresentam um lado mais largo que o lado das hidroxilas primárias. Devido à rotação livre das hidroxilas primárias, o diâmetro da cavidade no lado onde elas ocorrem se reduz, enquanto o grupo de hidroxilas secundárias mantém a sua cadeia rígida sem rotação (FROMMING; SZEJTLI, 1994; KOROLKOVAS, 1991; BEKERS *et al.*, 1991).

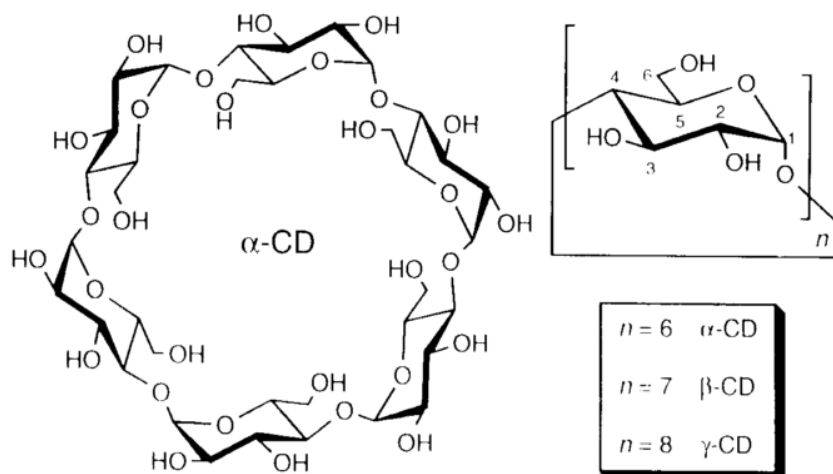
Figura 2.4 – Aspecto estrutural geral de uma ciclodextrina.



Fonte: Acervo pessoal

Devido a essa conformação, as CDs ainda apresentam um caráter hidrofílico no lado externo da molécula. No interior da estrutura, os pares de elétrons livres do oxigênio envolvidos em ligações glicosídicas são dirigidos para o interior da molécula, ocasionando uma elevada densidade eletrônica e por consequência um caráter apolar (MATIOLI *et al.*, 2000).

Figura 2.5 – Representação química e estrutural da α -CD



Fonte: CUCOLO, 2009.

Através dessas características é possível formar complexos com uma ampla variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas por inclusão molecular. Tal propriedade chamada de encapsulação molecular confere à substância complexada propriedades diferentes, aumentando a solubilidade de muitas moléculas hidrofóbicas, diminuindo a sua reatividade química, melhorando as propriedades de compostos instáveis, voláteis e oxidáveis. (BENDER, 1986; VAN DER VEEN *et al.*, 2000; SINGH, 2002).

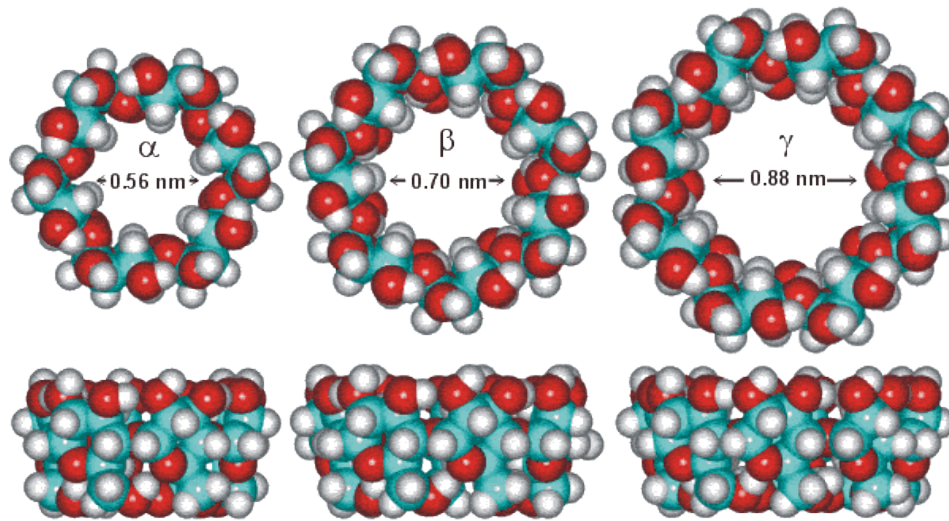
Existem ainda muitas ligações de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas secundárias de unidades de glicose consecutivas (-OH de C2 e C3). Essas fortes ligações estabilizam o microciclo das CDs e impedem a sua hidratação.

As hidroxilas ligadas a C2, C3 e C6 estão orientadas para o lado de fora da molécula e devido a essa conformação elas podem sofrer ataque químico com conseqüente modificação das CDs, sem alterar a cavidade central, o que possibilita a transformação das CDs em derivados com propriedades físico-químicas alteradas (HAUSLER; MULLER 1993; TARDIOLI 1998).

As CDs podem ser modificadas para diferentes fins, como melhorar a baixa solubilidade aquosa da β -CD e/ou diminuir a toxicidade em aplicações. Essas modificações são dadas através dos grupos das hidroxilas das CDs que são utilizadas como pontas iniciadoras deste processo. Assim, muitos grupos funcionais têm sido incorporados nas moléculas de CDs. Um exemplo são as metilciclodextrinas, também conhecidas como MeCD. Foram estes os primeiros derivados descritos na literatura. A metilação conduz a produtos parcialmente substituídos (C2 e C6), conhecidos como dimetilciclodextrinas, ou totalmente substituídos como as trimetilciclodextrinas (C2, C3 e C6). Esses derivados apresentam maior solubilidade que as CDs naturais (WOUESSIDJEWE; DUCHÊNE, 1994).

As dimensões das CDs variam de acordo com o número de unidades de glicose que as constituem. Como cada CD apresenta o diâmetro de sua cavidade interna diferente, a formação de complexos também é diferenciada, ou seja, com diferentes tamanhos de moléculas hóspedes, sendo a γ -CD a melhor para este propósito (BEKERS *et al.*, 1991). As dimensões das principais CDs são apresentadas na figura 2.6 e listadas na tabela 2.2.

Figura 2.6 – Dimensões geométricas das CDs.



Fonte: acervo pessoal

Tabela 2.2 - Propriedades físico-químicas das principais ciclodextrinas.

Característica	α -ciclodextrina	β -ciclodextrina	γ -ciclodextrina
Número de monômeros de glicose	6	7	8
Massa Molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade em água (g/L - 25°C)	145	18,5	232
Diâmetro externo (Å)	14,6	15,4	17,5
Diâmetro interno (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Volume da cavidade interna (Å ³)	174	262	427

Fonte: Adaptada de PRADO *et al.*, 2000.

Segundo Horikoshi (1979), a β -CD é a mais importante para a formação de complexos de inclusão, pois os complexos são mais estáveis e de maior facilidade de preparo e o seu rendimento de produção a partir do amido é mais alto quando comparado com outras CDs, fator esse que a torna a principal CD de uso industrial.

A baixa solubilidade da β -CD em água (Tabela 2.2) ocorre devido a presença de muitas ligações de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas secundárias de unidades de

glicose consecutivas, tais como as OH em C2 e C3. Um cinturão secundário completo é formado por essas ligações de hidrogênio na molécula de CD, 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 β -CD possuir uma solubilidade menor comparada às outras CDs. A destruição dessas ligações de hidrogênio por substâncias como uréia, resulta num aumento da solubilidade da β -CD. Na molécula de α -CD, esse cinturão de ligações de hidrogênio é incompleto, devido à posição distorcida de uma unidade de glicopironose. Como consequência, somente quatro das seis ligações de hidrogênio podem ser estabelecidas. A γ -CD 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 tende a aumentar com a elevação da temperatura (BEKERS *et al.*, 1991; KOROLKOVAS, 1991; HAUSLER; MULLER-GOYMANN, 1993; FRÖMMING; SZETLI, 1994).

As CDs ainda não possuem ponto de fusão definido e começam a sofrer decomposição a 200°C, uma vez que suas propriedades térmicas dependem do teor de água, da estrutura cristalina, da composição da atmosfera e do grau de aquecimento (MORIWAKI *et al.*, 2007).

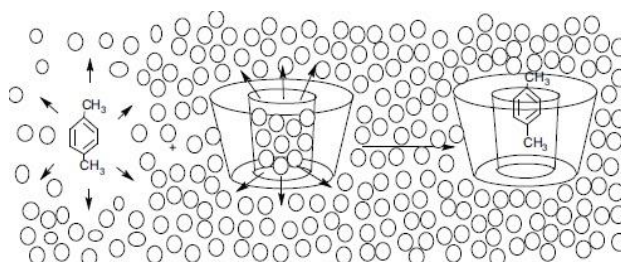
As CDs em meio alcalino são estáveis, porém a hidrólise ácida parcial das CDs produz uma série de maltooligosacarídeos e glicose. Segundo Bender (1986), a resistência à hidrólise ácida das CDs é de 3 a 5 vezes maior (dependendo da temperatura e da acidez) que aquelas das dextrinas lineares correspondentes.

2.5 Inclusão molecular

A principal característica de uma CD é a sua capacidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de compostos (moléculas hóspedes). A condição mínima para que se forme um complexo de inclusão é que a molécula hóspede deve adequar-se completa ou parcialmente na cavidade da CD (molécula hospedeira) (SCHIMID, 1989; MATIOLI *et al.*, 2000).

O processo de inclusão ocorre pela retirada das moléculas de água que estão presentes na cavidade interna das CDs. À medida que a molécula hóspede é adicionada a uma solução de CDs, a mesma ocupa a cavidade hidrofóbica, expulsando as moléculas de água (BEKERS *et al.*, 1991; KOROLKOVAS, 1991). A Figura 2.7 ilustra a formação de um complexo.

Figura 2.7 - Representação esquemática da formação de um complexo de inclusão entre p-xileno (molécula hóspede) e CD (molécula hospedeira).



Fonte: SZEJTLI, 1988; FRÖMMING; SZEJTLI, 1994; CITERNESI; SCIACHITANO, 1995; MATIOLI, 2000.

Complexos estáveis não são formados com moléculas hóspedes pequenas, pois podem escaparem facilmente do interior da cavidade. Moléculas volumosas também não são complexadas, pois não conseguirão penetrar na cavidade, porém, se cadeias ou grupos laterais de uma cadeia volumosa conseguirem se acomodar na cavidade, a formação de um complexo se torna possível (BEKERS, *et al.*, 1991).

Geralmente os complexos formados estão na razão 1:1 (CD:hóspede), entretanto, se a molécula for muito grande para acomodar-se na cavidade de uma CD, outra molécula de CD pode participar da complexação, formando complexos 2:1. Também podem ser formados complexos de inclusão nas razões 2:2, 3:1, 3:2, 4:5, 1:2, etc. Particularmente, devido ao maior tamanho da cavidade da γ -CD, esta é mais adequada para formação de complexos 1:2 (BEKERS, *et al.*, 1991).

Muitas dúvidas ainda existem quanto à natureza da força de ligação, a natureza da estrutura da água em torno ou próximo do complexo de inclusão e também a dinâmica molecular de inclusão. O que se sabe é que as interações de van der Waals, a energia de conformação e os agrupamentos de água comandam o processo de inclusão (MATIOLI *et al.*, 2000; CUCOLO, 2009).

Existem algumas formas de proceder a encapsulação molecular, sendo elas em solução ou no estado sólido. Em estado sólido, as moléculas hóspedes podem ser inseridas na cavidade ou agregadas do lado externo das moléculas de CD, já em solução ocorre um equilíbrio entre as moléculas hóspedes complexadas e as não complexadas (BEKERS *et al.*, 1991; TARDIOLI, 1998).

O processo de complexação é de extrema importância e tem se destacado ao longo do tempo em diversos setores industriais, com modificações vantajosas, tais como, a inclusão de drogas em moléculas de CDs, na qual os compostos adquirem maior estabilidade, solubilidade em água e, conseqüentemente, maior utilidade farmacêutica e biodisponibilidade após a administração oral da droga, entre outros benefícios (SZENTE; SZEJTLI, 1986).

2.6 Aplicações das Ciclodextrinas

As aplicações das CDs nos diversos setores industriais têm aumentado ao longo do tempo. Desde a descoberta das CDs em 1891, esses compostos têm sido estudados para a aplicação por muitas companhias (HORIKOSHI, 1998).

As CDs são usadas nos diferentes segmentos industriais com o intuito de estabilizar compostos voláteis, tais como, aromas e sabores, desodorizar fármacos e alimentos, proteger princípios ativos contra oxidação e forte degradação, aumentar a solubilidade de medicamentos insolúveis em água, mascarar gostos amargos de alimentos e fármacos (KITAYSKA *et al.*, 2011).

As CDs são de grande interesse no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas. Nos últimos anos têm surgido diversos sistemas de administração de fármacos visando à obtenção de fármacos com cinética de liberação modelada, mais estável e de melhor absorção.

Alguns problemas como a perda de atividade por parte do princípio ativo de um medicamento quando ingerido via oral, possibilitaram com que surgissem novos sistemas, pois o trato gastrointestinal destrói parcialmente o ativo. Ao nível industrial, o conceito de medicamento tem evoluído muito no sentido de se obter parâmetros farmacocinéticos adequados à ação pretendida, melhorando a eficácia do fármaco, prolongando o seu efeito ou ainda melhorando seu índice terapêutico, de forma que não apresente efeitos colaterais (SALTÃO; VEIGA 2001).

Muitos países têm aprovada a utilização de CDs ou derivados de CDs em alguns produtos, tais como, Voltaren oftálmico (complexo diclofenacossódico/hidroxipropil γ -CD), Flogene (complexo Piroxicam/ β -CD), Nicorette (complexo nicotina/ β -CD), gomas de mascar,

xampus, etc. (LOFTSSON; MASSON, 2001; SZEJTLI, 2004). A Tabela 2.3 lista os principais fármacos comerciais que contem CDs na sua formulação, com destaque para a companhia Brasileira Aché, produtora do Flogene.

Outro setor de muito interesse e também de amplos estudos e perspectivas futuras para o uso de CDs em suas formulações é o setor de cosméticos, que vem crescendo rapidamente a cada ano, porém ainda há muito que se avaliar e estudar com relação as CDs e suas aplicações. A Tabela 2.4 mostra um resumo das principais vantagens das CDs em alguns setores industriais.

Tabela 2.3 – Principais fármacos comerciais complexados com CDs.

Complexo	Nome comercial	Indicação	Compania/País
PGE2/β-CD	Prostarmom E	Inibidor de parto	Ono(Japão)
PGE2/γ-CD	Prostvasin	Má circulação arterial	Ono(Japão)
Piroxicam/β-CD	Cicladol/Brexin	Anti-inflamatório/Analgésico	Masterpharma/Chiesi(Itália)
Iodo/β-CD	Mena-Gargle	Infecção na garganta	Kyushin(Japão)
Dexametasona, Glyeter/β-CD	Glymesason	Anti-inflamatório/Analgésico	Fujinaga(Japão)
Clorafenicol/β-CD metilada	Clorocil	Antibiótico	Oftalder(Portugal)
Piroxicam/β-CD	Flogene	Anti-inflamatório/Analgésico	Aché(Brasil)
Nicotina/β-CD	Nicorette	Dependência em nicotina	Pharmacia Upjonh(Suécia)
Omeprazol/β-CD	Omebeta	Antiulceroso	Bethafarm(Alemanha)
Diclofenaco sódico/Hidroxiopropil-γCD	Voltaren Oftálmico	Anti-inflamatório	Novartis(Suíça)

Fonte: Adaptado de Caderno de farmácia, 1994.

Tabela 2.4 – Resumo das principais vantagens e aplicações das ciclodextrinas.

Setor	Vantagens	Aplicações	Referências
Alimentos	Estabilização de cores e aromas;	Sucos de frutas, bombons e chá;	DUCHÊNE, 1987;
	Redução de sabores e odores desagradáveis;	Extrato de Plantas	SZEJTLI, 1988;
	Estabilização de emulsões.	Molhos e queijos; Sopas de peixe, e etc.	PSZCZOLA, 1988
Farmacêutico	Estabilização (calor, oxidação);	Anti-inflamatórios;	DUCHÊNE, 1987;
	Aumento da biodisponibilidade;	Substitutos sanguíneos;	SZEJTLI, 1988;
	Aumento da solubilidade.	Antibióticos e anticolesterol	FRÖMMING; SZEJTLI 1994
Cosméticos	Estabilização (calor, hidrólise, oxidação);	Bases emulsificantes;	FRÖMMING; SZEJTLI 1994;
	Redução da volatilidade;	Loções, desodorantes;	CITERNESI;
	Transformação de líquidos aditivos em pó.	Crems, pastas.	SCIACCHIATANO, 1995.
Agrícola	Estabilização de fungicidas;	Piretrinas;	
	Controle de germinação;	Cereais;	SZEJTLI, 1988.
	Aumento da ação de pesticidas	Organofosforados.	
Analítico	Interações específicas entre moléculas hóspedes e CDs;	Cromatografia de afinidade, CLAE;	ARMSTRONG <i>et al.</i> , 1986;
	Resolução ótica.	Separação enantiomérica.	ARMSTRONG, 1988.
Outros	Inclusão de bactérias;	Meio de cultivo;	SZEJTLI, 1986;
	Protetor contra substâncias tóxicas	Despoluição ambiental	SALIPIRA <i>et al.</i> , 2006
	Aumento na qualidade das reproduções.	Fototermografia.	SZEJTLI 1990.

Uchida e Suzuki (1998), a partir de uma mistura de reação com CGTase, obtiveram o composto α - γ -glicosiltiamina. Após inclusão com a CD, o composto apresentou odor reduzido e sabor adocicado, sem sabor adstringente na língua. Assim, a inclusão foi responsável pela melhoria da qualidade final do produto, relacionada ao aroma, gosto e forma dos alimentos (VAUTION *et al.*, 1987).

Há muitos relatos na literatura sobre a importância das pesquisas e das aplicações das CDs, e sobre as áreas abrangentes dessas aplicações. Através dos trabalhos reportados na literatura e citados nesta revisão pode-se observar um alto crescimento e interesse na utilização das CDs devido às vantagens obtida pela a formação de complexos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes analíticos

Para a realização deste trabalho os principais reagentes utilizados foram: Peptona G da Acumedia[®], extrato de levedura da Himedia[®], Dextrina da Sigma Aldrich[®], amido da Qhemis[®] e solução tampão tris-HCl da HEXAPUR[®]. Todos os demais reagentes eram de grau analítico.

3.1.2 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o *Paenibacillus* sp., F37 e F20, cepas que foram gentilmente doadas pela Profa. Dra. Lucy Seldin do instituto de Microbiologia da UFRJ. As linhagens foram armazenadas em criotubos a -80°C contendo 210 μL de meio de cultura e 90 μL de glicerol estéril/água 80% (v/v).

3.1.3 Extrato enzimático

A enzima utilizada foi obtida a partir do meio de cultivo Horikoshi com amido, centrifugado a 4000g e 4°C por 20 minutos e armazenado congelado a -4°C , em tubos falcon e de microcentrífuga, com 1,5ml e 50ml, respectivamente, sendo posteriormente descongelado para análise da atividade enzimática, produção de CDs, e caracterização da enzima bruta.

3.1.4 Substrato enzimático

As atividades enzimáticas foram analisadas a partir da ação da enzima sobre solução de 1% (m/v) dextrina (10,0 g dextrina para 1,0 L de tampão tris-HCl 0,1 M (12,11 g de tris em 1,0 L de água destilada) com pH ajustado para 8,0.

3.1.5 Ciclodextrinas padrões

Para a dosagem de CDs utilizaram-se como padrões α -CD (massa molecular de 973 g/mol), β -CD (massa molecular de 1135 g/mol) e γ -CD (massa molecular de 1297,14 g/mol), da Sigma Aldrich[®]. Para as determinações colorimétricas de α -CD, β -CD e γ -CD utilizaram-se, fenoltaleína e sal de sódio de verde de bromocresol, da Synth.

3.1.6 Reatores e equipamentos

3.1.6.1 Reator

Foi usado um reator de vidro encamisado de volume útil de 100 ml para ensaios de atividade de ciclização da CGTase e um de volume útil de 500 ml para os ensaios de produção de CDs.

3.1.6.2 Principais equipamentos

- a) Agitador magnético IKA^R C-MAG HS 7;
- b) Agitador de tubos de ensaio IKA^R;
- c) Balança analítica DENVER INSTRUMENT;
- d) Banho termostático NOVA ÉTICA empregado nos ensaios de atividade de ciclização;
- e) Bomba de vácuo PRISMATEC;
- f) Centrífuga EPPENDORF 5810 R;
- g) Espectrofotômetro ULTRASPEC 2100 PRO;
- h) Estufa B.O.D 411 D;
- i) pH-metro QUALXTRON QX 1500;
- j) Shaker INNOVA^R 44;

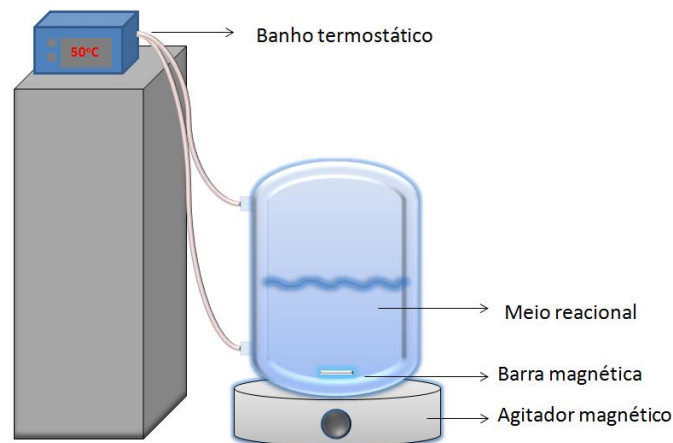
3.2 Métodos Analíticos

3.2.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade de ciclização da CGTase foi determinada pela medida da velocidade inicial de produção de β -CD, utilizando-se como substrato uma solução de dextrina 10 g/L (20 ml), preparada em tampão tris-HCl 0,01 M, pH 8,0 e contendo 5 mM de CaCl₂. A reação

era iniciada pela adição de um volume de extrato enzimático em um reator termostaticado a 50°C, equipado com agitação magnética (Figura 3.1).

Figura 3.1 – Esquema representativo do sistema experimental para medida da atividade de ciclização da CGTase.



Inicialmente foi preparado um controle com 2 ml de substrato retirado do reator. Após a adição da enzima foram retiradas alíquotas de 2 ml do meio reacional em intervalos de 5 min, até 20 min de reação. Cada amostra foi adicionada a tubos de ensaio e imediatamente levada a fervura por 5 min a 100°C para a inativação da enzima, e em seguida resfriados em água a temperatura ambiente. Todos os tubos de ensaio eram de rosca para que não houvesse a perda da amostra por evaporação.

Para cada tempo de reação determinou-se a concentração de β -CD e γ -CD pelos métodos colorimétricos descritos no item 3.2.2.1 e 3.2.2.2 para avaliar a melhor cepa (F20 ou F37) produtora de CGTase. Todos os dados de produção de ciclodextrina ($\mu\text{moles CD}/(\text{min} \times \text{mL})$) foram plotados em função do tempo de reação e o coeficiente angular da reta ajustada (b) foi utilizado para calcular a atividade pela equação 1 (TARDIOLI, 1998), adaptada aos parâmetros e condições dos experimentos realizados:

$$A = (b \times V_R \times D) / V_{SE} \quad (1)$$

Em que: A é a atividade enzimática em $\mu\text{moles CD}/(\text{min} \times \text{ml de solução enzimática})$, b é o coeficiente angular da reta ajustada em $\mu\text{moles CD}/(\text{min} \times \text{ml})$, D é a diluição da solução

enzimática, V_R é o volume reacional em ml e V_{SE} é o volume em ml da solução enzimática diluída para as condições do teste.

Uma unidade de atividade (U) corresponde a quantidade de CGTase que produz um micromol de β -CD por minuto nas condições de reação.

3.2.2 Dosagem de ciclodextrinas

3.2.2.1 Dosagem colorimétrica de β -CD

Este método consiste em se misturar 0,5 mL de amostra contendo a β -CD, com 2,5 mL de solução de fenolftaleína 0,06 mM, preparada pela mistura de 2,0 mL de uma solução alcoólica estoque de fenolftaleína 3,0 mM, 20 mL de tampão carbonato 0,6 M, pH 10,5 e 78 mL de água destilada. A absorbância é lida imediatamente a 550 nm, utilizando água destilada para calibração do equipamento e uma solução contendo 0,5 mL de água destilada e 2,5 mL da solução de fenolftaleína 0,06 mM como branco.

A concentração de β -CD, para amostras que não sofrem interferência pela γ -CD e pela dextrina, é determinada através equação 2 (TARDIOLI, 1998) adaptada aos parâmetros e condições dos experimentos realizados. A constante 6000 que aparece na equação 2 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) e pela transformação da concentração expressa em M para mM (i.e. 1000).

$$C_{\beta\text{-CD}} = 6000 a (1 - \text{ABS}/\text{ABS}_0) [1 + \text{ABS}_0 / (K_{\beta\text{-CD}} a \text{ABS})] \quad (2)$$

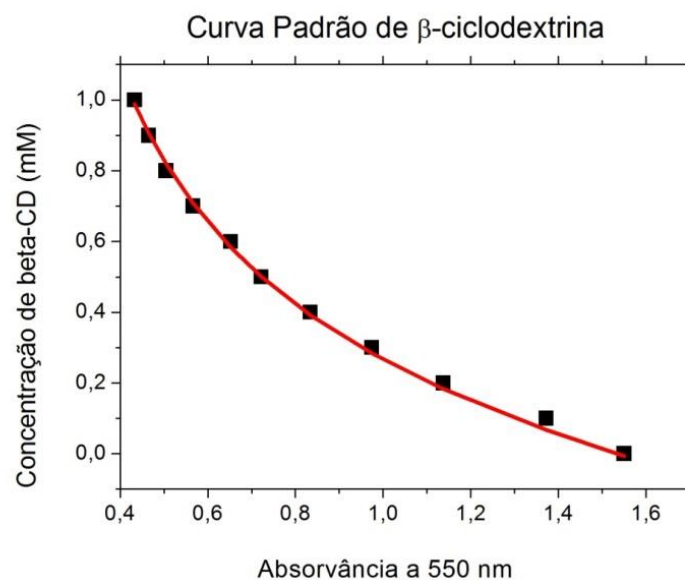
Em que: a é a concentração total de fenolftaleína nas condições de dosagem (a solução de fenolftaleína 0,06 mM sofre uma diluição de 1,2 vezes, sendo, portanto sua concentração final igual a 5×10^{-5} M), ABS é a absorbância da amostra, lida a 550 nm, ABS_0 é a absorbância do branco, lida a 550 nm; $C_{\beta\text{-CD}}$ é a concentração de β -CD, expressa em mM; $K_{\beta\text{-CD}}$ é a constante de equilíbrio da formação do complexo β -CD/PHE.

O valor da constante de equilíbrio do complexo β -CD/PHE foi determinado preparando-se uma curva padrão de absorbância em função da concentração de β -CD, na faixa de 0 a 1 mM. A solução estoque de β -CD 1 mM foi preparada dissolvendo 0,1135 g de

β -CD em 20 mL de tampão tris-HCl, pH 8, 0,05 M, 10 mL de solução de cloreto de cálcio 50 mM, e 70 mL de água destilada.

As diversas concentrações de β -CD, para a faixa de 0 a 1 mM, foram obtidas diluindo-se a solução estoque 1 mM em tampão tris-HCl, pH 8, 0,01 M/solução de cloreto de cálcio 5 mM. A Figura 3.2 mostra o resultado do ajuste não linear obtido através do software Origin Pro7 com o valor da constante de equilíbrio $K = 19737,03 \pm 220,64 \text{ M}^{-1}$ e $R^2 0,9976$. TARDIOLI, 1998 e 2004 obteve valores da constante de equilíbrio na ordem de $K = 17363,02 \pm 125,22 \text{ M}^{-1}$ e $K = 18014,82 \pm 125,22 \text{ M}^{-1}$ respectivamente.

Figura 3.2- Curva padrão de β -Ciclodextrina



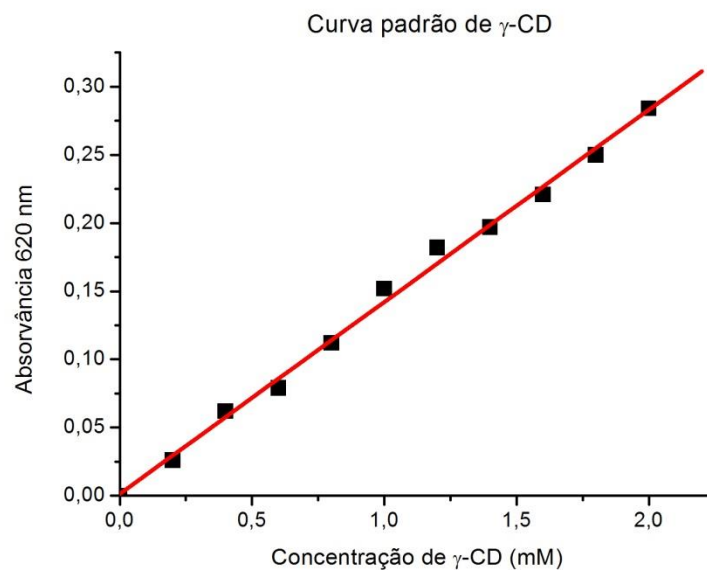
3.2.2.2 Dosagem colorimétrica de γ -CD

A dosagem de γ -CD consiste em se misturar 0,5 mL da amostra contendo a γ -CD com 2,5 mL de uma solução de verde de bromocresol 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 verde de bromocresol 0,5 mM é preparada no momento da dosagem, misturando-se 10 mL de uma solução estoque de verde de bromocresol 5 mM (0,36 g de verde de bromocresol 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, 5 mL de solução de hidróxido de sódio 2 M e completando-se o volume para 100mL com água destilada (TARDIOLI, 1998).

A curva de calibração foi construída utilizando-se amostras de concentrações conhecidas de γ -CD, na faixa de 0 a 2 mM preparadas com o tampão tris-HCl pH 8, 0,01M e a solução de cloreto de cálcio 5 mM, a partir de uma solução estoque de γ -CD 2 mM. A solução estoque de γ -CD 2 mM foi preparada dissolvendo 0,26 g de γ -CD e completando-se o volume total para 100 mL com solução tris-HCl, pH 8, 0,01 M e cloreto de cálcio 5 mM. A Figura 3.3 mostra o ajuste linear da plotagem dos valores de concentração de γ -CD versus absorvância.

Figura 3.3 – Curva padrão de γ -ciclodextrina.



A curva foi utilizada na metodologia de dosagem de γ -CD nos primeiros cultivos e as atividades volumétricas foram obtidas através da equação 3 feito o ajuste linear em software Oringim Pro7. As dosagens foram realizadas com a finalidade de saber se a as cepas F20 e F37 eram produtoras majoritariamente de β ou γ -CD e também avaliar qual das cepas se mostraria como melhor na produção da enzima.

$$A_{620} = 0,1409 C_{\gamma\text{-CD}} + 0,0014 \quad (3)$$

Onde A é a absorvância da amostra lida a 620 nm, o valor de 0,1409 e 0,0014 é o coeficiente angular e linear da reta respectivamente e $C_{\gamma\text{-CD}}$ é a concentração de $\gamma\text{-CD}$, expressa em mM.

3.2.2.3 Caracterização cromatográfica de $\alpha\text{-CD}$, $\beta\text{-CD}$ e $\gamma\text{-CD}$

CDs foram caracterizadas por cromatografia líquida em cromatógrafo Waters, equipado com detector de índice de refração (IR) ajustado em 45°C e auto-injetor ajustado em 4°C. As amostras de CDs (padrões e meio reacional) eram filtradas em membrana de 0,2 μm e um volume de 20 μL eram injetados em uma coluna Shodex Sugar KS-802 (styrene divinylbenzene copolymer Sulfo (Na^+), 7 μm , 8 ID x 300 mm) a 80°C. As CDs ($\alpha\text{-}$, $\beta\text{-}$, e $\gamma\text{-CD}$) eram separadas com água como fase móvel a uma vazão de 1 mL/min.

Os tempos de retenção de cada CD, bem como suas curvas padrões, foram determinados com padrões de $\alpha\text{-}$, $\beta\text{-}$, e $\gamma\text{-CD}$ (Sigma-Aldrich), maltose e glicose (Synth).

As análises de CDs a partir do meio reacional de produção sofriam interferência por dextrinas residuais. Assim, as amostras (1 mL do meio de produção de CDs ao final de 92 h) eram previamente tratadas com amiloglicosidase (0,5 mL) de *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich) a 60°C, por 1 h, a fim de se hidrolisar as dextrinas residuais a glicose e maltose, principalmente. Ao final de 1 h, as amostras eram fervidas a 100°C para inativar a enzima e, portanto, interromper a reação de hidrólise.

3.2.3 Medida de densidade ótica do crescimento celular (DO)

Foi realizado acompanhamento da densidade ótica do meio de cultivo durante os ensaios de produção de CGTase para análise do crescimento celular. A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm.

3.2.4 Medidas de massa seca (MS)

As medidas de massa seca foram realizadas a partir de amostras do meio de cultivo (10 mL), as quais eram filtradas a vácuo em membrana de 0,2 μm , previamente secas a 60°C, por 24 h. Os pellets eram lavados com 20 mL de água destilada e secos (pellets e membrana) a 60°C por 24 h. Os resultados de massa seca eram determinados pela Equação (3),

$$MS = \frac{m}{V}$$

Em que: **MS** é a massa seca de células expressa em g/L, **m** é a massa seca (em gramas) retida na membrana de 0,2 µm, e **V** é o volume do meio de cultivo usado no ensaio, expresso em litros.

3.3 Procedimento experimental

Neste trabalho foram avaliadas duas cepas de *Paenibacillus* sp. (F20 e F37) isoladas pelo Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (UFRJ, Rio de Janeiro). Os pesquisadores do Instituto de Microbiologia/UFRJ fizeram uma prospecção de estirpes formadoras de esporos a partir de solo (Cerrado e Várzea) capazes de produzir CDs. As cepas que apresentaram maiores halos em placa de petri (F20 e F37) foram identificadas como pertencentes ao gênero *Paenibacillus*.

As cepas foram analisadas primeiramente quanto ao crescimento celular e posteriormente analisadas quanto a produção da enzima CGTase.

3.3.1 Reativação e pré-inóculo das cepas.

Ao longo do trabalho, dois meios de cultura básicos foram utilizados, o meio TSB ágar e o meio Horikoshi (NAKAMURA; HORIKOSHI, 1976). A composição dos meios é mostrada respectivamente nas Tabelas 3.1 e 3.2. O meio TSB ágar foi usado nas etapas de reativação quando retirado da solução crioprotetora e o meio Horikoshi foi empregado nas demais etapas do processo: pré-inóculo (meio sólido), inóculo e produção, sendo que para cada uma dessas etapas havia pequenas variações nas concentrações.

As cepas armazenadas em ultrafreezer passavam inicialmente por um processo de reativação em meio sólido TSB ágar (Tabela 3.1). Após plaqueamento as cepas eram mantidas a 30°C por 48 horas em incubadoras e posteriormente uma colônia isolada era transferida para a etapa de pré-inóculo, plaqueadas em meio Horikoshi sólido a pH 8,0 por 24 horas.

Tabela 3.1 – Composição do meio TSB ágar usado para a reativação do *Paenibacillus*.

Reagentes	Concentração (g/l)
Digerido pancreático	3,4
Digerido papaínico de soja	0,6
NaCl	1,0
K ₂ HPO ₄	0,5
Ágar	3,0
Dextrose	0,5

Após as etapas de reativação e pré-inóculo em meio sólido, as cepas seguiam para a etapas de inóculo e produção de CGTase em meio Horikoshi líquido. A etapa de inóculo foi realizada em meio Horikoshi líquido sem amido, a pH 8,0 (Tabela 3.2). Este era mantido em câmara incubadora rotativa, a 120 rpm e 37°C por 15 horas.

Tabela 3.2 – Meio Horikoshi das etapas de pré-inóculo, inóculo e produção.

Composição do Meio Horikoshi	Concentração (g/l)		
	Pré-inóculo	Inóculo	Produção
Amido	10,0	-	5,0
Peptona	5,0	5,0	2,5
Extrato de levedura	5,0	5,0	2,5
K ₂ HPO ₄	1,0	1,0	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	0,2	0,1
Ágar	10,5	-	-

3.3.2 Inóculo e produção de CGTase

As etapas de inóculo e produção foram realizadas em frascos de 500 ml e 250 ml respectivamente, contendo 50 ml de meio para ambos os frascos, e os mesmos eram incubados em câmara rotativa a 120 rpm e 37°C. Em alguns ensaios o tempo da etapa de produção não foi constante, uma vez que nas etapas iniciais do trabalho este fator era um dos principais pontos que visávamos analisar com intenção de otimizar o tempo de cultivo.

As etapas que antecederam o inóculo foram realizadas de duas formas neste trabalho. A primeira envolvia, após a retirada do microrganismo do ultrafreezer, sua reativação em meio TSB ágar (reativação) e depois estriamento de uma das colônias formadas em meio Horikoshi sólido em tubo de ensaio inclinado (pré-inóculo), cada tubo contendo 5 ml de meio. Para a transferência do pré-inóculo para o inóculo utilizava-se parte do meio de inóculo (Horikoshi líquido sem amido) para desprender as células do *slant*. Posteriormente, o conteúdo era vertido no frasco de 250 ml completando-se 50 ml de meio de inóculo e levado para a câmara incubadora rotativa. A segunda envolvia a retirada do microrganismo do ultrafreezer armazenado em solução crioprotetora e sua passagem direta para o meio Horikoshi líquido, com volume final de 50 ml de meio de inóculo em frasco de 250 ml, sem passar pelas etapas de reativação e pré-inóculo, o que diminuiria o tempo total do cultivo em 48 horas.

Realizado o inóculo, a inoculação do meio de produção foi realizada da mesma forma em todos os cultivos. Os meios de produção continham geralmente 45,0 mL de meio em frascos de 250 ml, e a eles eram adicionados 5,0 mL de inóculo. Logo em seguida, o frasco inoculado era levado para câmara rotativa 120 rpm e 37°C para produção da enzima.

3.3.3 Caracterização físico-química da enzima bruta

Para a caracterização da enzima bruta foram utilizadas as amostras de 16h dos cultivos conduzidos a 37°C, pois estes foram apontados como os melhores parâmetros para a produção da enzima. As atividades de CGTase foram determinadas com relação à produção de β -CD, monitorados pelo método CD:fenolftaleína.

3.3.3.1 pH ótimo

O pH ótimo de ciclização da CGTase bruta foi avaliado a 50°C, utilizando como substrato soluções de dextrina 1% (m/v), preparadas nos seguintes tampões: tampão citrato 0,1M, pH 5,0; tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,0 e pH 7,0; tampão tris-HCl 0,1M, pH 8,0 e pH 9,0 e tampão Glicina/NaOH 0,1M, pH 10,0.

3.3.3.2 Temperatura ótima

A temperatura ótima de ciclização foi determinada na faixa de 30 a 70°C, com intervalos de 10°C, pelas medidas de atividade com solução de dextrina 1% (m/v), preparada em tampão citrato 0,1 M, pH 6,0 (pH ótimo previamente determinado).

3.3.3.3 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da CGTase bruta foi avaliada pela incubação de 5 ml de solução enzimática a 50°C e pH 6,0 (condições ótimas previamente estabelecidas). Em intervalos de 1 hora, mediam-se as atividades de ciclização residuais.

3.3.4 Ensaios de produção de ciclodextrinas

A produção de CDs foi realizada incubando 10 ml de extrato enzimático bruto em um reator de 500 ml do tipo batelada acoplado em um banho termostático a 50°C, usando como substrato 100 ml solução de dextrina 50g/L preparada em tampão tris-HCL 0,1M, pH 8,0. Foi utilizado nos ensaios de produção de CDs o caldo de cultivo de 16h, o qual apresentou a melhor atividade de CGTase.

Amostras do meio reacional foram quantificadas quanto à concentração de β - e γ -CD, por métodos colorimétrico e cromatográfico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos na avaliação da capacidade de produção da enzima CGTase a partir de duas cepas de *Paenibacillus* (F20 e F37), isoladas de solo de cerrado e várzea, gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Lucy Seldin do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (UFRJ, Rio de Janeiro).

Os ensaios de produção de CGTase foram iniciados em uma iniciação científica (IC) anterior a este trabalho. Os resultados até então obtidos pelo trabalho de IC serviram de base para os experimentos seguintes. A partir de uma revisão da literatura foi encontrado que o melhor pH para crescimento de outras cepas de *Paenibacillus* e produção de CGTase eram pHs alcalinos, variando em torno de 10. Esses valores alcalinos de pH eram também utilizados para outros microrganismos produtores de CGTase. Entretanto, neste trabalho, resolveu-se testar uma faixa maior de pH para as cepas F20 e F37 de *Paenibacillus* sp.

Para ter um conhecimento prévio que fizesse com que os estudos de produção de CGTase a partir dessas cepas fosse compensatório foi realizado no trabalho de IC um cultivo de produção da enzima em pHs 8,0 e 9,0 para determinação da atividade enzimática nos tempos 52 e 120 horas de cultivo. O período de 120 horas foi baseado em informações da literatura sobre o tempo do cultivo para produção de CGTase por outros microrganismos. Neste cultivo, a produção de CGTase pela cepa F20 foi muito baixa quando comparada com a cepa F37, ou seja, observou-se que os cultivos realizados com a cepa F37, nas mesmas condições da F20, apresentaram níveis maiores de atividade enzimática.

Embora este ensaio tenha sido bem preliminar, os resultados obtidos nos deram a indicação para trabalharmos com a cepa F37 e, além disso, nos forneceram também a indicação de que 120 horas poderia ser um tempo excessivo de cultivo, já que máxima atividade para ambas as cepas tinha sido obtida no tempo de 52 horas. Esse tempo poderia ser até menor visto que não foram tiradas amostras em tempos regulares menores para observar o ponto de máxima atividade.

A partir destes resultados foi dada sequência aos experimentos de produção de CGTase por *Paenibacillus* sp. F37. Nos ensaios que se seguiram foi utilizado tempo de cultivo de 72 horas, que foi posteriormente reduzido em virtude dos resultados do tempo de máxima atividade obtidos. Um dos objetivos era tentar encontrar qual o tempo de máxima produção,

mas sempre com o interesse de diminuir ainda mais o tempo de cultivo, o que se mostrou possível somente no final do trabalho.

A seguir serão reportados os ensaios e os principais resultados de produção da enzima CGTase por *Paenibacillus* sp. obtidos até o momento neste trabalho.

4.1 Ensaios de crescimento da cepa F37 em placa com diferentes valores de pH

Uma maneira rápida de observar qual o melhor pH para crescimento de um microrganismo é fazer o plaqueamento em meio sólido em diferentes valores de pH e observar após determinado tempo de incubação qual placa apresenta maior número de colônias. Assim, selecionada a cepa F37, foi realizado ensaio de crescimento em meio sólido a diferentes valores de pH. O objetivo foi verificar se para a cepa selecionada seria confirmado que o maior crescimento e talvez a produção da enzima se daria mesmo em pH 10. Para isso foram preparadas placas com meio Horikoshi sólido na faixa de pH de 6 a 10. As placas foram preparadas a partir da semeadura estriada do microrganismo e incubação em estufa a 37°C por 48h. As fotos das placas mostrando o crescimento do microrganismo nos vários pHs após 48 horas são apresentadas na Figura 4.1.

Observando o crescimento do microrganismo em meio Horikoshi sólido nas placas, constatou-se visualmente que o maior crescimento se deu em pH 8,0. Assim, passou-se a adotar esse pH em todas as etapas do cultivo. Esse valor de pH discordava dos resultados reportados na literatura para a produção de CGTase tanto para outras cepas de *Paenibacillus* como para outros microrganismos. Por isso, num momento posterior do trabalho, foi testada a produção da enzima em pH 10.

Nesse momento, como os resultados indicaram maiores crescimentos em pH 8,0 e 9,0, sendo observado na placa de pH 8,0 maior número de colônias, adotou-se este pH como padrão de crescimento do microrganismo em placa e até mesmo nos cultivos líquidos, de inóculo e de produção.

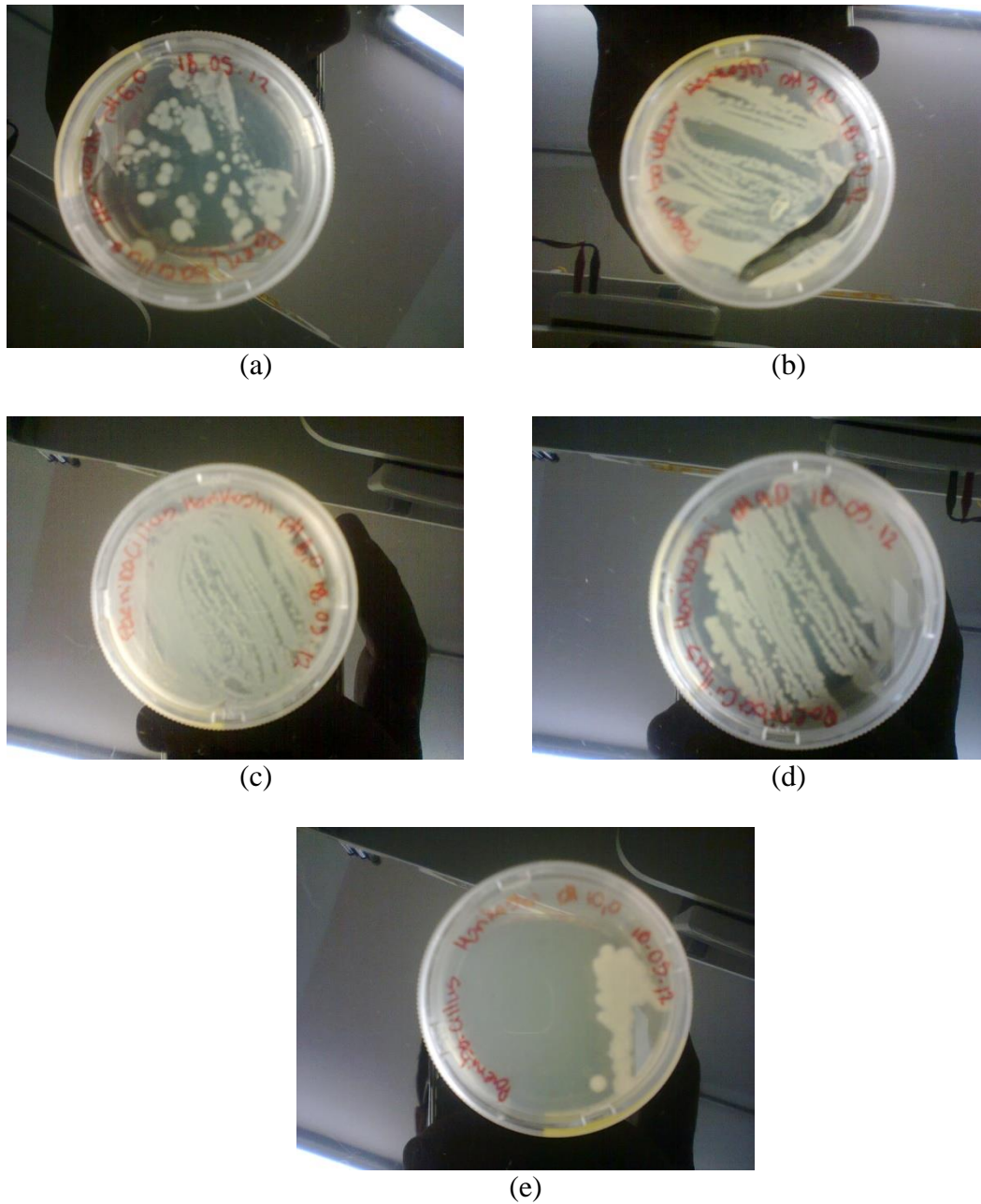


Figura 4.1: Crescimento em placa de *Paenibacillus* sp. F37. (a) pH 6,0; (b) pH 7,0; (c) pH 8,0; (d) pH 9,0 e (e) pH 10.

Fonte: Acervo pessoal

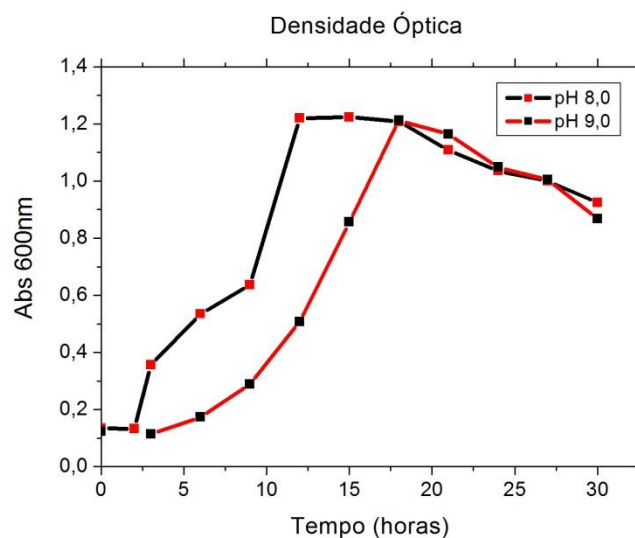
4.2 Curva de crescimento da estirpe *Paenibacillus* sp. F37

Assim como é reportado na literatura, a produção de CGTase foi realizada através de cultivos em 4 etapas. Uma etapa de reativação em meio TSB sólido (48 horas), uma etapa de pré-inóculo em meio Horikoshi sólido (24 horas), uma etapa de inóculo em meio líquido (48 horas) e uma etapa de produção em meio líquido (acima de 72 horas). Assim, realizou-se um ensaio completo com todas as etapas, até o inóculo, e acompanhamento do crescimento por

densidade ótica na etapa de inóculo para verificar se esta etapa em meio líquido poderia ter o tempo reduzido, pois com uma duração de 48 horas poder-se-ia estar passando o microrganismo para o meio de produção não na fase de crescimento exponencial e sim na fase de morte celular.

As condições adotadas em cada etapa deste cultivo foram as seguintes: (1) reativação em placa usando meio TSB sólido a 37°C por 48 horas em câmara incubadora; (2) pré-inóculo em placas, a partir do estriamento de uma colônia isolada da placa de reativação, em meio Horikoshi sólido contendo amido, pH 8,0, 37°C, por 24 horas; (3) inóculos para acompanhamento da DO de crescimento do microrganismo e construção da curva de crescimento em meio Horikoshi líquido, sem amido, um a pH 8,0 e outro a pH 9,0, ambos ajustados inicialmente sem o acompanhamento do pH ao longo do tempo de incubação, em câmara incubadora rotativa, a 37°C e 120 rpm. A ausência de amido nesta etapa foi para que o microrganismo se empenhasse apenas no crescimento e não na produção da enzima. A amostragem era realizada a cada três horas para a medida da absorbância (DO). A Figura 4.2 mostra a curva de crescimento do *Paenibacillus* sp. F37 em pH 8,0 e 9,0.

Figura 4.2 – Curva de crescimento celular do *Paenibacillus* sp. F37 em meio Horikoshi líquido a 37°C, pH 8,0 e 9,0, em termos de D.O. a 600 nm.



Foi feita uma tentativa de medir a massa seca, porém os valores ficaram imprecisos (resultados não mostrados). A concentração celular era muito baixa e dava muita imprecisão

na pesagem das membranas, produzindo uma curva inconstante e pouco confiável. Sendo assim, trabalhou-se apenas com a D.O. obtida com leitura em espectrofotômetro a 600 nm.

Observa-se na Figura 4.2 que o crescimento do inóculo em pH 8,0 apresenta valores de DO ligeiramente maiores que a pH 9,0, no qual o microrganismo apresentou um fase *lag* ligeiramente maior (em torno de 6 horas). O crescimento na fase de inóculo a pH 8,0 é mais acentuado nas primeiras horas, assim, possuindo um crescimento mais rápido, atingindo o final da fase exponencial em torno de 12 horas. Portanto, selecionou-se o pH 8,0 como padrão de crescimento. Para este pH, observou-se maior D.O. entre 12 e 15 horas de cultivo, ficando estabelecido o tempo de 15 horas de passagem do inóculo para o meio de produção e não mais as 48 horas utilizadas anteriormente.

Posteriormente, realizaram-se os ensaios de produção da enzima inoculando o meio de produção no momento em que o microrganismo atinge a metade de sua fase logarítmica, objetivando inocular o meio de produção com uma maior concentração de células metabolicamente ativas.

4.3 Cultivo a partir de *Paenibacillus* sp. F37 conservado em placas e criotubos

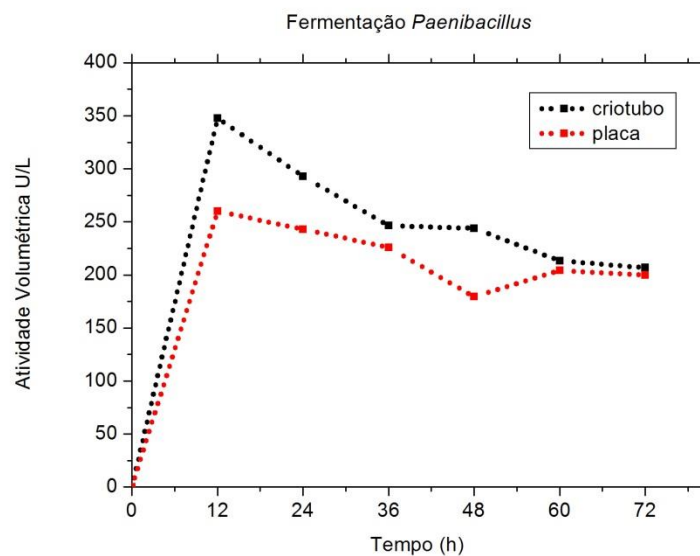
Após a verificação de que se poderia reduzir o tempo do inóculo, analisou-se também a possibilidade de se reduzir as etapas anteriores ao inóculo, uma vez que o tempo total de cultivo ainda permanecia demasiadamente longo, quando se considerava as 48 horas de reativação e as 24 horas de pré-inóculo. Para que o processo de produção de CGTase fosse competitivo era necessário tentar diminuir ainda mais o tempo total de cultivo.

Como já era rotina no laboratório armazenar microrganismos em criotubos a -80°C , resolveu-se preparar criotubos contendo *Paenibacillus* sp. F37 e dispensar as etapas de reativação (48 horas) e pré-inóculo (24 horas) em meio sólido. Assim, o microrganismo era diretamente transferido do criotubo para o inóculo, reduzindo em 72 horas a duração total dos ensaios de produção.

Dessa forma, para comparar as duas metodologias, foram realizados dois cultivos de produção de CGTase, um usando o processo de reativação (48 horas), pré-inóculo (24 horas) e inóculo (15 horas), que foi chamado de **placa** e outro partindo-se direto dos criotubos para a etapa de inóculo, que foi chamado de **criotubo**. Em todos os casos foram realizados cultivos

em duplicata. Para o ensaio de **placa** as condições utilizadas foram as já descritas anteriormente: meio de reativação TSB sólido, pH 8,0, mantido por 48 horas; pré-inóculo em meio Horikoshi sólido, pH 8,0, mantido por 24 horas; inóculo em meio Horikoshi líquido por 15 horas e meio de produção por 72 horas. Para o ensaio **criotubo** foi utilizado o microrganismo que estava armazenado em solução crioprotetora (300 μ l) direto no inóculo que continha meio líquido Horikoshi, pH 8,0, que após 15 horas foi transferido para o meio de produção de CGTase por 72 horas. Em todos os experimentos foram retiradas amostras a cada 12 horas de ensaio. Os resultados dos cultivos são mostrados na Figura 4.3.

Figura 4.3 – Gráfico comparativo dos ensaios de produção de CGTase a partir de cultivo de *Paenibacillus* sp. F37 (37°C, pH 8,0). A atividade volumétrica foi monitorada por medida de atividade ciclização (μ moles β -CD/min) a 50°C, pH 8,0, usando-se dextrina (1%, m/v) como substrato.



Observa-se pela Figura 4.3 que as maiores atividades volumétricas de CGTase ocorreram, para os dois ensaios, por volta de 12 horas de cultivo. Porém, observou-se também que os maiores valores foram obtidos para o ensaio em que a etapa de inóculo foi simplificada, transferindo-se diretamente o microrganismo do criotubo para o inóculo e, posteriormente, para o meio de produção.

Os resultados de atividade volumétrica de CGTase obtida para ambos os métodos de cultivos de *Paenibacillus* sp. F37 permitem uma comparação direta devido à similaridade dos tempos máximos de produção. O cultivo de criotubo apresentou atividade volumétrica e produtividade de CGTase superiores ao cultivo de placa, 87,6 U/L e 7,3 U/L.h⁻¹, respectivamente. Assim, escolhendo-se o cultivo a partir de criotubo como metodologia padrão, o tempo de cultivo total foi reduzido. Uma comparação do tempo das duas metodologias é mostrada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Comparação do tempo de produção de CGTase por cultivo de *Paenibacillus* sp. F37 a 37°C, pH 8,0.

Etapas de cultivo	Placa	Criotubo
Reativação (horas)	48	0
Pré-inóculo (slants), horas	24	0
Inóculo (horas)	15	15
Produção (horas)	até 48	até 48
Tempo final (dias)	~ 6	~ 3

Tendo como base os resultados destes cultivos passou-se a utilizar o ensaio com o tempo otimizado para a produção da enzima. Com isso, foi possível diminuir o tempo total de cultivo em 72 horas (duração das duas etapas anteriores ao inóculo).

Alguns trabalhos reportados na literatura apresentam amido tanto no pré-inóculo quanto no inóculo para crescimento do microrganismo. CUCOLO *et al.* (2006) avaliaram diversos tipos de fonte de carbono no meio de produção da enzima, partindo de um pré-inóculo contendo 1% de amido solúvel. PRADO *et al.* (2002) utilizaram amido solúvel (10g/l) na etapa de isolamento do microrganismo e também nas etapas de crescimento microbiano e produção da enzima. Nos estudos realizados por CUCOLO *et al.*, (2006), visando a otimização da produção de CGTase por *Bacillus* sp. usando diferentes substratos, mostram que utilizando amido solúvel nas condições de cultivo de 35°C, agitação de 150 rpm e 48 horas foi obtida uma atividade enzimática de 1.400 U/L. A melhor produção da enzima foi obtida utilizando amido doce como substrato, em torno de 1.800 U/L. Essa produção é cerca de 4 vezes maior comparado com o valor de atividade obtida nesse trabalho através do

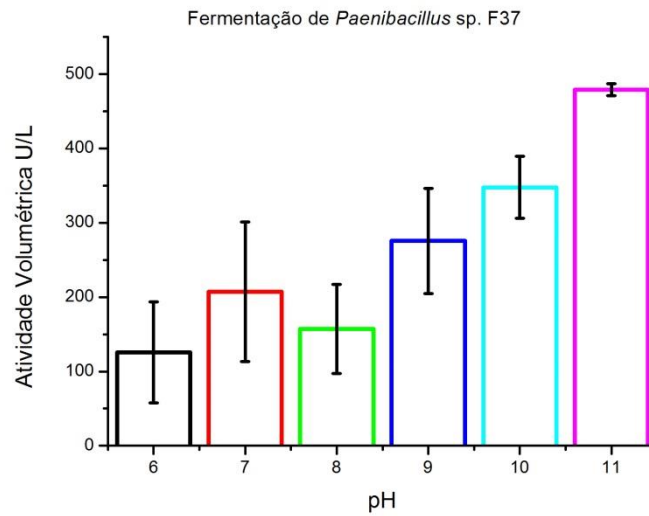
cultivo de criotubo, que foi de 347 U/L. Vale ressaltar que é difícil uma comparação precisa, devido às diferenças nas condições de cultivo (pH, temperatura, fonte do amido, etc.) e medidas das atividades de ciclização da CGTase, além, é claro, do microrganismo produtor.

4.4 Cultivo submerso em diferentes valores de pH

Definido o tempo de duração de cada uma das etapas do cultivo de *Paenibacillus* sp. F37, voltou-se aos estudos do pH dos cultivos. Como já citado, o pH 8,0 foi escolhido por ter sido neste pH que o *Paenibacillus* sp. F37 apresentou maior crescimento em meio Horikoshi sólido com amido. Assim, os meios, tanto de inóculo quanto de produção tinham sido preparados neste pH. Entretanto, estes valores não estavam de acordo com a literatura, uma vez que, para a maioria dos microrganismos produtores de CGTase, o melhor pH de produção da enzima é alcalino, variando de 10 a 12. Dessa forma foram realizados ensaios de produção em diferentes pHs para verificar qual o melhor pH de produção em cultivo submerso.

Assim, na sequência, foram realizados ensaios de produção de CGTase com as etapas de inóculo e de produção já otimizadas e etapa de produção iniciada em diferentes pHs. Na etapa de inóculo foi utilizado meio Horikoshi líquido, sem amido, a pH 8,0, mantido a 37°C em câmara incubadora rotativa a 120 rpm por 16 horas. Para a etapa de produção, variou-se o pH do meio de produção Horkoshi de 6,0 a 11,0. Os meios de produção foram mantidos em erlenmeyers sob agitação em câmara incubadora rotativa termostatzada em 37°C. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas. O pH foi ajustado com adição de soluções de HCl e NaOH em quantidade suficiente para alcançar o pH desejado. Nestes cultivos não foram retiradas amostras durante o experimento, simplesmente analisou-se as atividades enzimáticas após 24 horas de cultivo nos diferentes valores de pH testados. Os resultados das atividades enzimáticas dos ensaios ao final da etapa de produção são mostrados na Figura 4.4.

Figura 4.4: Atividade enzimática de CGTase em cultivos de *Paenibacillus* sp. F37 a 37°C e diferentes valores iniciais de pH.



Analisando os resultados da Figura 4.4 observa-se que as maiores atividades enzimáticas foram obtidas em pHs 10 e 11, atingindo inclusive valores de atividades maiores que os obtidos anteriormente para meio de produção iniciado em pH 8,0 (todos os resultados anteriores). Portanto, os resultados obtidos com este ensaio estão de acordo com os dados apresentado na literatura que indicam maior produção de CGTase em pHs alcalinos.

Como não foi utilizado nenhum tampão para a manutenção do pH do meio ao longo dos cultivos, foram medidos o pH no início e no final do ensaio de produção. Esperava-se, portanto uma variação do pH ao longo do experimento. A Tabela 4.2 apresenta os valores dos pHs inicial e final da etapa de produção. Pode-se observar que todos os cultivos apresentaram queda de pH que foi maior para os maiores valores de pH inicial.

Tabela 4.2: Valores de pH, inicial e final, em cultivos de *Paenibacillus* sp. F37 a 37°C.

pH Inicial	pH Final
6,0	5,8
7,0	5,2
8,0	5,9
9,0	5,2
10,0	5,3
11,0	6,6

Estes resultados indicam que a produção de CGTase por *Paenibacillus* sp. F37 também é mais pronunciada em pH alcalino. Porém, é importante destacar que o pH não foi controlado (como a maioria dos relatos da literatura) e mesmo os cultivos que iniciaram em pH alcalino, depois de determinado tempo, atingiram valores na faixa de pH levemente ácido. Portanto, os maiores valores de atividades podem ser explicados pelo fato do pH ter iniciado em alcalino e ter permanecido mais tempo nessa condição, favorecendo assim a produção da enzima.

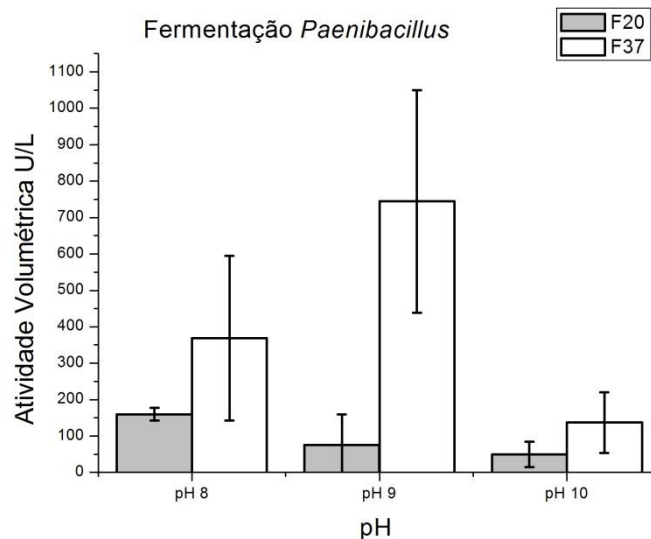
4.5 Cultivo de *Paenibacillus* sp. F37 para as cepas F20 e F37 em meio tamponado

A partir dos resultados dos cultivos descritos no item 4.4 para a cepa F37 de *Paenibacillus* sp. em que se observou maiores valores de atividades para os cultivos iniciados na faixa de pH alcalino, realizou-se cultivos em três diferentes valores, 8,0, 9,0 e 10,0 na etapa de produção da enzima. Além disso, como para a cepa F20 não havia sido realizado nenhum cultivo submerso, optou-se também por realizar os mesmos ensaios utilizando esta cepa, para comparação e confirmação dos resultados anteriormente obtidos no trabalho de iniciação científica, em que a cepa F20 foi descartada dos estudos por apresentar baixa atividade enzimática de CGTase.

Assim, na sequência foram realizados ensaios de produção de CGTase com as cepas F20 e F37 também com as etapas de inóculo e de produção já otimizadas e etapa de produção com meio tamponado em pH 8,0, 9,0 e 10,0. As condições do inóculo foram as mesmas dos ensaios anteriores, meio Horikoshi líquido sem amido, pH 8,0, 37°C, em câmara incubadora rotativa a 120 rpm por 16 horas. Após 16 horas, 5 mL do inóculo foram transferidos para os meios de produção de cada uma das cepas ajustados nos valores de pH selecionados. Não foram retiradas amostras ao longo do cultivo, sendo avaliada somente a atividade enzimática após 16 horas, pois se observou de resultados anteriores que as máximas atividades são atingidas em menos de 24 horas de cultivo. Para cada um dos valores de pH foi utilizado tampão específico, tris-HCL 0,1 M para pH 8,0 e 9,0 e carbonato 0,1 M para pH 10,0.

A Figura 4.5 mostra os resultados das atividades enzimáticas obtidas para os cultivos realizados em duplicata nos três pHs diferentes de meio de produção.

Figura 4.5 – Produção de CGTase por fermentação submersa de *Paenibacillus sp.* cepas F20 e F37 a 37°C, 120 rpm e pH 8,0 (tampão tris-HCL 0,1 M), pH 9,0 (tampão tris-HCl 0,1 M) e pH 10,0 (tampão carbonato 0,1 M).



Observa-se na Figura 4.5 que a cepa F37 mostrou-se uma melhor produtora de CGTase, com atividades volumétricas superiores às da cepa F20 em todos os valores de pH testados. Para a cepa F20, os resultados obtidos confirmam os já observados anteriormente, a baixa atividade para esta cepa quando comparada à cepa F37.

Assim pode-se observar que a produção de CGTase em pH inicial 9,0 conduziu à maior atividade volumétrica (821 U/L). Ressalta-se aqui que a concentração utilizada do tampão (0,1 M) não foi suficiente para tamponar o meio de produção durante todo o tempo de cultivo, mas evitou que o pH reduzisse bruscamente, como nos cultivos anteriores onde o pH inicial 9,0 foi ajustado e a máxima produção de CGTase foi de 347 U/L.

Os altos valores dos erros padrões, mostrados na Figura 4.5, devem-se, provavelmente, ao fato dos cultivos serem realizados a partir de diferentes inóculos, os quais foram preparados a partir de diferentes criotubos, contendo, possivelmente, quantidades diferentes de células. Esse problema poderia ser contornado preparando-se um único inóculo, o qual seria usado para compor diferentes meios de produção.

O pH ótimo de produção de CGTase depende do seu microrganismo produtor ser ou não alcalofílico. Os resultados deste estudo sugerem que essa linhagem de *Paenibacillus sp.* trata-se realmente de uma bactéria alcalofílica, com crescimento ótimo em pH 9,0. PRADO *et*

al., (2002), estudaram a influência do pH na produção de CGTase por uma linhagem do gênero *Bacillus* sp. subgrupo *alcalophilus* E16 e obtiveram máxima atividade em pH 5.5. LARSEN *et al.*, (1998), obtiveram máxima atividade de CGTase em pH 7,5 em cultivo de uma bactéria do gênero *Paenibacillus* sp. Portanto, a comparação com resultados reportados na literatura é dificultada frente à grande variedade de microrganismos produtores de CGTase, cada qual com suas particularidades.

4.6 Cultivo de *Paenibacillus* sp. F37 a partir de inóculo com e sem amido em diferentes tempos de crescimento celular

Nesta etapa do trabalho avaliou-se a produção de CGTase a partir de inóculos preparados a 37°C, pH 8,0 na presença ou ausência de amido (indutor da produção da enzima), bem como com diferentes tempos de inoculação. Os cultivos foram realizados a 37°C, pH 9,0 e 16 h, a partir de inóculos preparados na ausência e presença de amido (1 g/L) e transferidos para o meio de produção após 10 e 15 h de crescimento, tempos esses necessários para alcançar metade e final da fase logarítmica do crescimento, respectivamente.

A Figura 4.6 mostra que a presença de amido na formulação do inóculo não influenciou a produção de CGTase, atingindo níveis similares de atividade volumétrica. Entretanto, o tempo de inoculação foi uma variável muito importante na produção da enzima. Observa-se na Figura 4.6 e Tabela 4.3 que o cultivo com inóculo de 10 h atingiu uma produção volumétrica de CGTase aproximadamente quatro vezes superior à produzida com inóculo de 15 h. Esse resultado mostra que é de extrema importância transferir o inóculo para o meio de cultivo em plena fase de crescimento logarítmico, garantindo-se assim um número elevado de células viáveis.

Figura 4.6 – Influência da presença de amido solúvel na formulação do inóculo de *Paenibacillus* sp. F37 e tempo de inoculação (37°C, pH 8,0) na produção de CGTase a 37°C, pH 9,0, 16 h de cultivo.

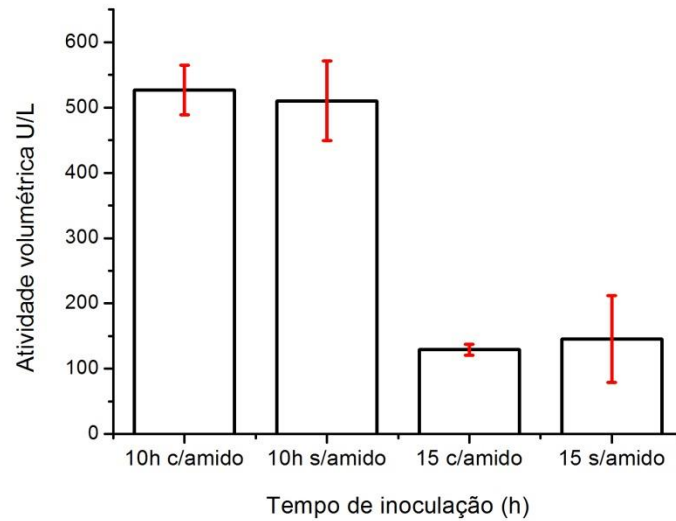


Tabela 4.3 – Atividade volumétrica de CGTase e concentração celular do inóculo e meio de produção de *Paenibacillus* sp. F37 a 37°C, pH 9,0, 16 h. Concentração celular é expressa em termos de D. O. em 600 nm.

Tipo de Inóculo	Atividade U/L	D.O do inóculo	D.O do meio de cultivo
10h c/amido	526,85	0,190	0,478
10h s/amido	510,45	0,155	0,482
15h c/amido	129,15	0,174	0,146
15h s/amido	145,55	0,185	0,079

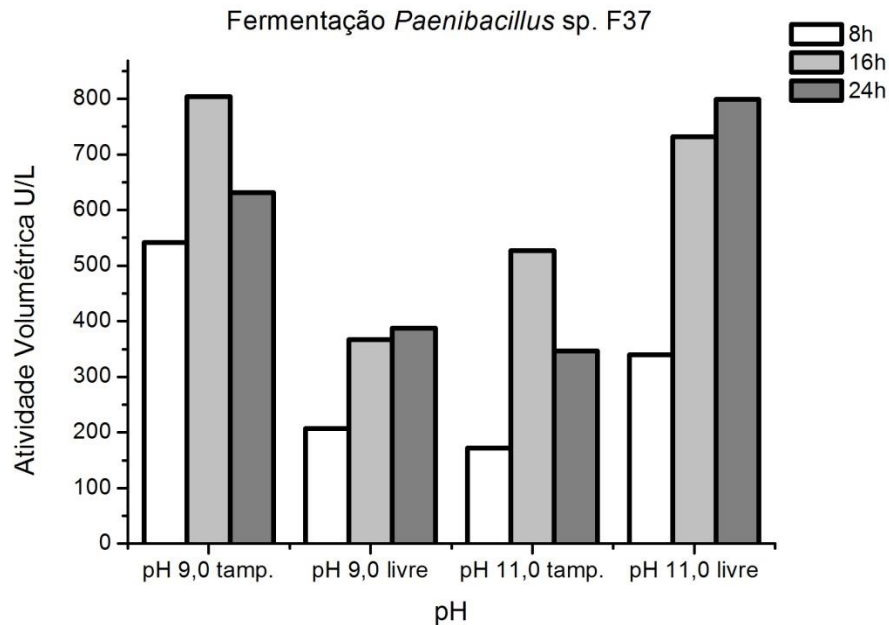
Observa-se que as D.O. dos inóculos apresentaram valores similares (de 0,16 a 0,19), independentemente da presença de amido ou tempo de inoculação. Entretanto, a concentração celular (expressa em D.O.) do meio de cultivo usando inóculo de 10 horas é em média quatro vezes maior que aquela usando inóculo de 15 horas. Dessa forma, concluir-se que para aumentar a produção de CGTase, o inóculo deve ser preparado sem amido e com um tempo de crescimento de 10 h.

4.7 Cultivo de *Paenibacillus* sp. F37 em pH 9,0 e 11,0 em meio tamponado

Comparando os resultados obtidos nos itens 4.4 (pH livre ao longo do ensaio de produção) e 4.5 (pH parcialmente tamponado ao longo do ensaio de produção), vê-se que no pH livre os maiores valores de atividade foram obtidos para os ensaios com o pH iniciado em 11,0, e no meio tamponado, os maiores valores de atividades foram atingidos com o pH do meio ajustado inicialmente em 9,0. Dessa forma, foram realizados ensaios de produção de CGTase com a cepa F37 com pH livre, ou seja ajustado inicialmente em 9,0 e 11,0, e com pH tamponado em 9,0 e 11,0 ao longo de todo cultivo. O objetivo foi comparar os resultados das duas condições e finalmente definir qual delas é a melhor para a produção de CGTase por *Paenibacillus* sp. F37.

À exceção do ajuste do pH dos meios, todas as demais condições e procedimentos, tanto do inóculo quanto do meio de produção, foram mantidos constantes em relação aos ensaios anteriores. Os ensaios de produção tiveram um tempo de duração de 24 horas com retiradas de amostras a cada 8 horas, diferente dos ensaios descritos nos itens 4.4 e 4.5 em que só foi medida a atividade ao final do cultivo. A Figura 4.7 mostra os resultados obtidos para os pHs 9,0 e 11,0 tanto deixados livres como para o tamponado.

Figura 4.7 – Resultados de atividade enzimática dos ensaios de produção de CGTase por cultivo de *Paenibacillus* sp. F37 a 37°C e nos pHs 9,0 e 11,0 livre e tamponado.



Da figura 4.7 observa-se que o pH de melhor produção de CGTase (maior atividade em menor tempo) foi o pH 9,0 tamponado, com valor de atividade volumétrica na ordem de 803 U/L, próximo dos valores dos ensaios anteriores. Para este ensaio também se pode observar que o meio em pH 11,0 ajustado inicialmente, também resultou em ótimos valores de atividade. Uma hipótese seria o fato de que ao longo do cultivo este pH caiu e ficou mais próximo do pH ótimo (pH 9,0) de produção da enzima para este microrganismo. A queda no pH ocorre devido à presença de ácidos orgânicos produzidos ao longo do cultivo, deixando o pH mais ácido. Para este ensaio ainda foi medido o pH final de cada tempo de cultivo e os valores são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Valores de pH dos tempos de cultivo de *Paenibacillus* sp. F37 a 37°C com ajuste inicial de pH e tamponamento do meio de produção usando tampão tris-HCl 0,1M pH 9,0, tampão Glicina/NaOH 0,1 M pH 11,0.

Tempo de cultivo	0h	8h	16h	24h
pH 9,0 tamp.	9,0	8,07	6,68	6,21
pH 9,0 livre	9,0	5,68	5,03	5,04
pH 11,0 tamp.	11,0	9,60	9,46	9,43
pH 11,0 livre.	11,0	7,20	5,35	5,31

Através dos valores apresentados na Tabela 4.4 pode-se observar que o tamponamento do meio não foi eficiente para o cultivo, apresentando considerável queda do pH já nos tempos iniciais de produção da enzima, fortalecendo a hipótese de que o pH 9,0 é ótimo para o crescimento do microrganismo, mas ruim para a produção da enzima. Analisando a Tabela 4.6 e a Figura 4.7 verifica-se que a enzima CGTase atingiu sua máxima produção em torno de pH 6,0, com 16h de cultivo, tamponado em pH 9,0 com uma solução de tris-HCl 0,1M.

Para os tempos de cultivo no qual os valores de pH foram muito distintos a 6,0, a produção da enzima foi baixa. Destaca-se que o cultivo onde se tentou tamponar o meio de produção em 11,0 se manteve mais alcalino, resultando em uma baixa atividade volumétrica. Supõe-se que embora o pH 9,0 seja bom para o crescimento do microrganismo, pode levar à inativação da enzima produzida. Esta hipótese poderá ser confirmada com a caracterização da enzima quanto ao pH ótimo de ciclização e estabilidade térmica e alcalina.

Estudos reportados na literatura mostram que valores altos de atividades são obtidos principalmente por linhagens do gênero *Bacillus* como descrito por SARVERGAVE *et al.*, 2007, que através de uma linhagem do gênero *Bacillus firmus* obteve uma atividade na ordem de 7000 U/L. Outros valores de atividades para diferentes linhagens de microrganismos produtores de CGTase são mostrados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Valores de atividade enzimáticas (expressas em $\mu\text{moles } \beta\text{-CD}/\text{min}$) para a produção de CGTase a partir de diferentes linhagens.

Linhagem	Condições de ensaio	Atividade (U/ml)	Referência
<i>Paenibacillus pabuli</i> US132	Amido, pH 6,5 60°C	0,9	JEMLI <i>et al</i> 2007
<i>Bacillus</i> sp. subgrupo alcalophilus E16	Amido, pH 5,5 55°C	0,6	CUCOLO <i>et al</i> 2006
<i>Bacillus</i> sp. H25	Amido, pH 5,6 55°C	5,5	PRADO <i>et al</i> 2002
<i>Bacillus</i> sp. TS1-1	Amido, pH 6,0 60°C	73,4	MAHAT <i>et al</i> 2004
<i>Bacillus circulans</i>	Amido, pH 8,0 55°C	245,0	BLANCO 2009
<i>Bacillus lehensis</i> S8	Amido de Sagu, pH 6,0 60°C	17,5	YAP <i>et al</i> 2010
<i>Bacillus circulans</i> DF 9R	Amido, 5,5 40°C	5,8	ROSSO <i>et al</i> 2005
<i>Bacillus</i> G1	Amido de tapioca, pH 9,0 50°C	62,6	IBRAHIM <i>et al</i> 2010
<i>Paenibacillus</i> sp. F37	Dextrina, pH 8,0, 50°C	0,8	Presente estudo

Fonte: acervo pessoal

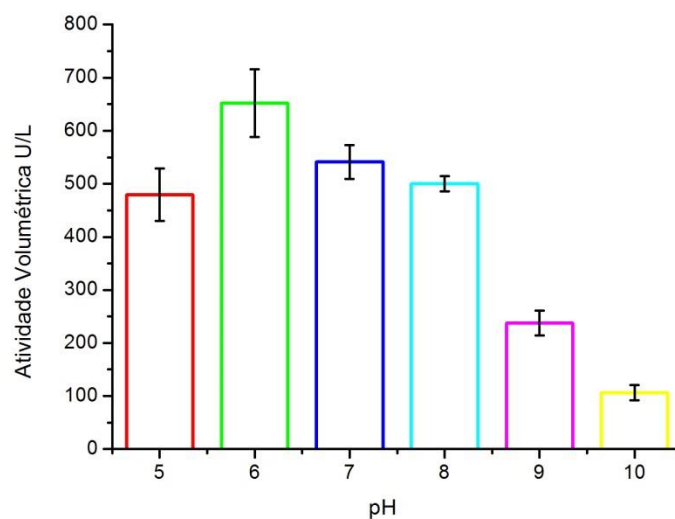
4.8 Caracterização físico-química da enzima

CGTase bruta produzida por *Paenibacillus* sp. F37 foi caracterizada quanto ao pH e temperatura ótima de ciclização (produção de $\beta\text{-CD}$), bem como quanto a sua estabilidade nas condições ótimas determinadas e nas condições de cultivo (37°C, pH 9,0). Este ensaio teve por objetivo principal verificar se a enzima produzida se mantém estável nas condições de cultivo. Nas medidas de atividade utilizou-se o extrato enzimático clarificado do meio de produção com 16 horas e dextrina 1% (m/v) como substrato. Para a avaliação do pH ótimo, a temperatura foi fixada em 50°C, e para a avaliação da temperatura ótima, o pH foi fixado no valor ótimo encontrado no ensaio de influência do pH na atividade enzimática.

4.8.1 pH ótimo

O ensaio de atividade de ciclização a 50°C em função do pH mostrou que a CGTase produzida por *Paenibacillus* sp. F37 exibe máxima atividade em pH 6,0, conforme mostra a Figura 4.8.

Figura 4.8 – Atividade volumétrica de CGTase produzida por *Paenibacillus* sp. F37 a 50°C e diferentes valores de pH. Os tampões utilizados foram os seguintes: citrato 0,1 M, pH 5,0; fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 e 7,0; tris-HCl pH 8,0 e 9,0 e glicina/NaOH 0,1M, pH 10,0.



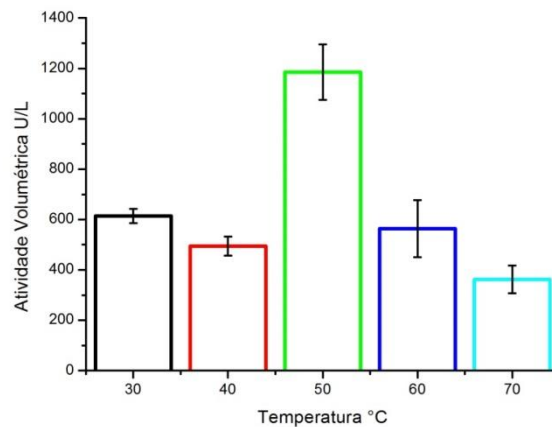
Esse resultado está de acordo com o pH ótimo de algumas CGTases reportadas na literatura, produzidas a partir de outros microrganismos. Por exemplo, ALVES-PRADO, 2000, verificaram que o pH ótimo de CGTase produzida por *Bacillus* sp. *alcalofilico* era de 5,5. SIAN *et al.*, 2005 obteve através de uma linhagem do gênero *Bacillus* sp G1 um pico de pH ótimo em 6,0. TONKOVA, (1998), em uma revisão de microrganismos produtores de CGTase, apresentou dados de caracterização da enzima, e para a linhagem do gênero *Bacillus macerans* ATCC 8514 o pH ótimo era 6,1-6,2. A Tabela 2.1.1 lista uma série de CGTase isoladas de microrganismos do gênero *Bacillus* que apresentam pHs ótimos similares ao obtido nesse trabalho.

Segundo GAWANDE *et al.*, 2003, a composição do meio de fermentação afeta significativamente as propriedades catalíticas da enzima produzida. Um parâmetro a ser avaliado futuramente no cultivo de *Paenibacillus* sp. F37 seria a fonte do amido (batata, milho, mandioca, etc.) utilizado como indutor da produção da CGTase.

4.8.2 Temperatura ótima

O ensaio de atividade de ciclização em pH 6,0 em função da temperatura mostrou que a CGTase de *Paenibacillus sp.* F37 tem atividade enzimática máxima em 50°C, conforme mostra a Figura 4.9. Nessas condições a atividade volumétrica da enzima foi em torno de 1200 U/L, valor esse no mínimo duas vezes superior aos obtidos nas outras temperaturas avaliadas.

Figura 4.9 – Atividade volumétrica de CGTase produzida por *Paenibacillus sp.* F37 a pH 6,0 e diferentes temperaturas. A enzima foi produzida em 37°C, pH 9,0, 120 rpm e 16 horas de cultivo.



A temperatura ótima da CGTase obtida neste trabalho está de acordo com a reportada para outras CGTases. Por exemplo, CUCOLO *et al.*, (2006), reporta 55°C como a temperatura ótima para uma CGTase produzida por *Bacillus alcalophilus* E16. Nessa temperatura, a atividade era 90% superior às medidas nas outras temperaturas estudadas. MATIOLI *et al.*, 1998, caracterizaram a CGTase produzida por *Bacillus* alcalofílico, linhagem 37, reportando atividade ótima em 50°C. ABELYAN *et al.*, 1991 e 1992, reportaram também atividade ótima em 50°C para CGTase produzida por *B. stearothermophilus* BKPMV-4905.

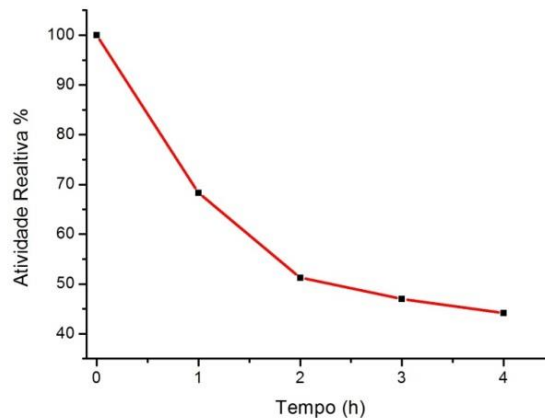
TONKOVA, (1998), em sua revisão sobre microrganismos produtores de CGTase, apresentou dados de caracterização de CGTases produzidas por diferentes linhagens bacterianas. Para a linhagem de *Bacillus macerans* ATCC 8514 a temperatura ótima foi de 60°C, e para outra linhagem do gênero *Bacillus sp* ATCC 21783 *alcalophilus* a temperatura ótima foi de 45°C. O autor concluiu que as CGTases tem máxima atividade entre pH 4,5 e 7,0 e em temperaturas entre 40°C a 85°C. Portanto, os valores de pH e temperatura de máxima

atividade encontrados nesse trabalho, 50°C e pH 6,0, encontram-se dentro das faixas citadas pelo autor.

4.8.3 Estabilidade térmica da enzima bruta

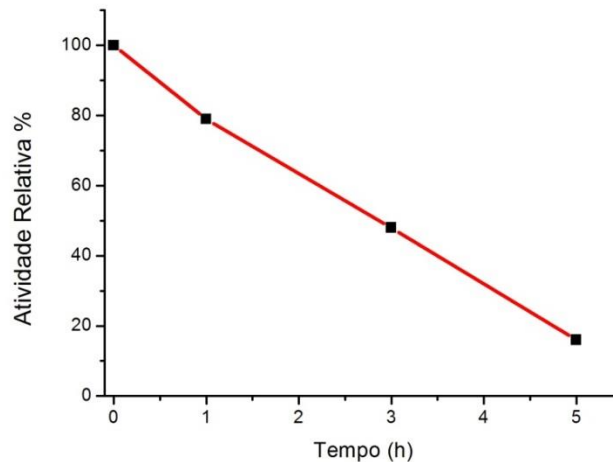
A estabilidade da CGTase de *Paenibacillus* sp. F37 foi avaliada nas condições de máxima atividade de ciclização (50°C, pH 6,0) e nas condições de cultivo do microrganismo (37°C, pH 9,0). Os resultados são mostrados nas Figuras 4.10 e 4.11. As meias-vidas aproximadas da enzima foram de 2,0 h (50°C, pH 6,0) e 3,0 h (37°C, pH 9,0).

Figura 4.10 - Estabilidade de CGTase de *Paenibacillus* sp. F37 a 50°C, pH 6,0. A atividade inicial de ciclização (formação de β -CD) foi considerada 100%.



A Figura 4.10 mostra um perfil suave de inativação da enzima, com retenção em torno de 70% da atividade inicial após uma hora de incubação, 50% após 2 horas e em torno de 45% após 4 horas de incubação a 50°C, pH 6,0. CUCOLO *et al.*, (2006), reportam que a CGTase produzida por *Bacillus alcalophilus* E16 retinha após 1 hora de incubação atividade de 100% a 50°C, 75% a 55°C e era completamente inativada a 80°C. TONKOVA, 1998, em sua revisão sobre caracterização de microrganismos produtores de CGTase relatou que para a linhagem do gênero *Bacillus* ATCC 8514 a enzima produzida retinha 100% de atividade até 60°C e que a CGTase de *Bacillus* sp INMIA A7/1 era estável na temperatura de 55°C. É bem provável que a estabilidade da CGTase produzida nesse trabalho aumente consideravelmente em temperaturas menores (40-45°C) e na presença de íons cálcio, como reportado por SABIONE e PARK, 1992, para a CGTase de *Bacillus lentus*.

Figura 4.11 - Estabilidade de CGTase de *Paenibacillus* sp. F37 a 37°C, pH 9,0. A atividade inicial de ciclização (formação de β -CD) foi considerada 100%.



A estabilidade da CGTase de *Paenibacillus* sp. F37 nas condições de cultivo (37°C e pH 9,0, conforme Figura 4.11) foi muito baixa, com 5 horas de incubação a enzima perde mais de 80% da atividade inicial. Esse resultado mostra claramente que as condições ótimas de crescimento do microrganismo podem diferir significativamente das condições ótimas para a estabilidade da enzima. Há, portanto, que se ter uma relação de compromisso entre crescimento e manutenção da atividade no meio de produção, pois grande parte da enzima produzida pode ter sofrido inativação durante as 16 horas de cultivo.

4.8.4 Cultivo de *Paenibacillus* sp. F37 em pH tamponado

Até então o que se sabia era que *Paenibacillus* sp. F37 crescia bem em pH 9,0, mas quando o pH da produção se mantinha em valores alcalinos, em torno de 9,5 (Figura 4.7 e Tabela 4.4) a atividade volumétrica era baixa. Ao contrário, quando a produção iniciava em pH 9,0 e ao longo do cultivo o pH atingia 6,2 a atividade volumétrica era alta. Essa condição poderia então estar conciliando valores bons de pH tanto para crescimento como para estabilidade da enzima produzida.

Decidiu-se então realizar novos cultivos do microrganismo com a manutenção do pH ao longo de todo o tempo de cultivo. Para isso, aumentou-se a concentração molar do tampão do meio de produção de 0,1 M para 0,5 M, garantindo-se assim o tamponamento do meio no pH desejado durante as 16 horas de cultivo. A Figura 4.12 e Tabela 4.6 mostram os resultados

de produção de CGTase em valores de pH variando de 6,0 a 11,0. Observa-se que a maior atividade volumétrica foi obtida em pH tamponado em 6,0. Entretanto, essa atividade foi aproximadamente 4 vezes inferior à obtida anteriormente em cultivo iniciando em pH 9,0 e variando em torno de 6,0 (pH ótimo da enzima) ao longo do cultivo.

Figura 4.12 – Cultivo de *Paenibacillus* sp. F37 a 37°C 120 rpm, pH 6,0 (tampão citrato 0,5M), pH 7,0 e 8,0 (tampão tris-HCl 0,5M), pH 8,0 e 9,0 (tampão carbonato de sódio 0,5M), pH 10,0 (1% de Na₂CO₃) e pH 11,0 (Glicina/NaOH 0,5M), 16h de cultivo.

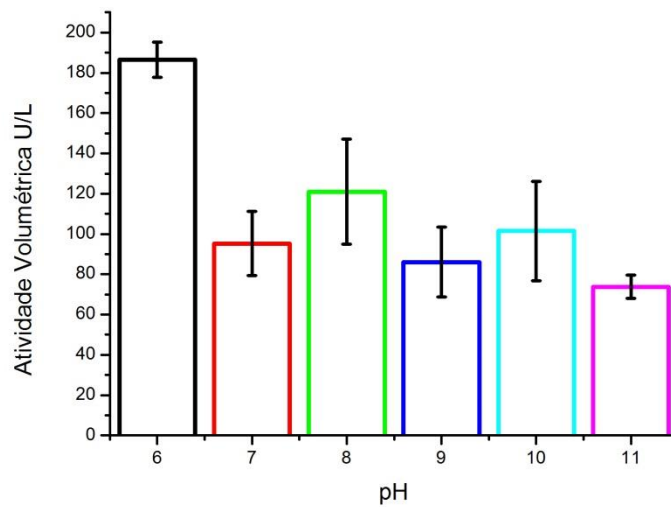


Tabela 4.6 – Valores de pH (inicial e final) e atividade (volumétrica e específica) de CGTase e do meio de produção de *Paenibacillus* sp. F37 a 37°C, em diferentes pHs, 16 h.

pH inicial	pH final	Atividade, U/L
6,0	6,1	186,55
7,0	7,0	95,32
8,0	8,0	120,95
9,0	9,1	86,10
10,0	9,7	101,50
11,0	9,8	73,80

4.8.5 Cultivo de *Paenibacillus* sp. F37 em pH variável e controlado

Até essa etapa do trabalho, as mais altas atividades volumétricas obtidas foram 821 U/L, para cultivo a 37°C, 120 rpm, 16 h, meio ajustado para pH 9,0 e 803 U/L, para cultivo a 37°C, 120 rpm, 16 h, meio preparado em tris-HCL 0,1 M, pH 9,0.

A fim de se verificar a reprodutibilidade das atividades volumétrica, realizaram-se novos cultivos com os meios preparados em tampão tris-HCL pH 9,0 nas concentrações de 0,1 M e 0,5 M, e os cultivos conduzidos por 24 h a 37°C, 120 rpm, com amostragem a cada 8 h. Nesses ensaios avaliou-se também a viabilidade das células armazenadas em solução crioprotetora de glicerol 30% (v/v) a -80°C, inoculando os meios de produção com criotubos armazenados por diferentes tempos em ultrafreezer.

As Figuras 4.13 e 4.14 mostram os resultados das atividades volumétricas obtidas a partir de cultivos realizados em duplicata, utilizando criotubos novos (com poucas semanas de armazenamento) e velhos (com meses de armazenamento).

Figura 4.13 – Produção de CGTase por cultivo de *Paenibacillus* sp. F37 a 37°C, 120 rpm, tampão tris-HCl (0,1 M e 0,5 M) pH 9,0, 24 h, inoculação do meio com criotubos novos.

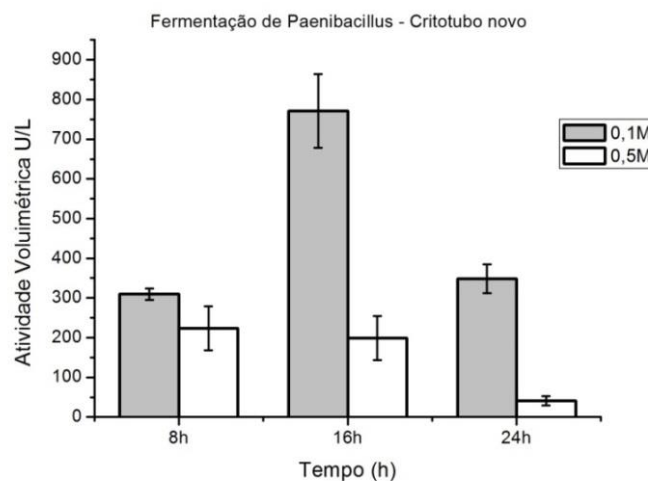
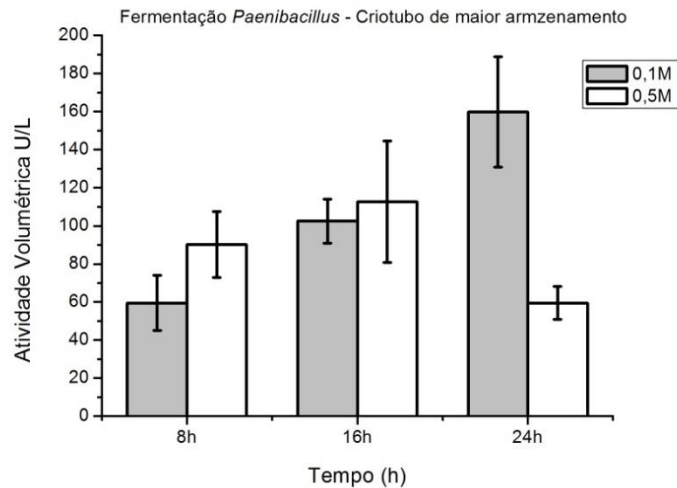


Figura 4.14 – Produção de CGTase por cultivo de *Paenibacillus* sp. F37 a 37°C, 120 rpm, tampão tris-HCl (0,1 M e 0,5 M) pH 9,0, 24 h, inoculação do meio com criotubos velhos.



Observa-se nas Figuras 4.13 e 4.14 que mais altas atividades volumétricas foram obtidas nos cultivos cujos meios de produção foram preparados em tampão tris-HCl 0,1 M, pH 9,0. Nessa condição, a atividade volumétrica atingiu 770 U/L, muito similar às obtidas anteriormente. Além disso, observa-se que nos cultivos inoculados com criotubos com longo tempo de armazenamento em ultrafreezer tiveram baixa produção de CGTase (atividade volumétrica em torno de 5 vezes menor, comparada no tempo de maior produção). Esse resultado pode explicar algumas grandes variações observadas em alguns cultivos (duplicatas) preparados a partir de diferentes criotubos.

Conclui-se, com esse experimento, que a metodologia de cultivo na etapa de produção da enzima CGTase pode ser padronizada como: 37°C, 120 rpm, 16 h, meio preparado em tampão tris-HCl 0,1 M. Além disso, a manutenção das células armazenadas em ultrafreezer deve ser periódica, aproximadamente 6 meses, evitando longos tempos de armazenagem.

A partir de uma comparação das atividades volumétricas listadas na Tabela 4.6, parecia-nos que *Paenibacillus* sp. F37 não se mostrava como um bom produtor de CGTase. Entretanto, essa comparação deveria ser mais criteriosa, usando como base as produtividades volumétricas.

Dessa forma, comparamos as produtividades volumétricas obtidas nesse trabalho com aquelas obtidas em um estudo recente de SILVA, 2014, que produziu CGTase a partir de *Bacillus firmus* usando condições semelhantes de cultivo. SILVA obteve inicialmente uma

atividade volumétrica de 0,77 U/mL, representando 8 U/L.h⁻¹, valor esse em torno de 6 vezes inferior ao obtido nesse trabalho (em média, 49,9 U/L.h⁻¹), conforme mostra a Tabela 4.7. Sob condições otimizadas, *Bacillus firmus* imobilizado em carvão de osso bovino, cultivado em leite fluidizado e suplementação de ar no meio de cultivo, SILVA, 2014, obteve atividade volumétrica máxima de 2700 U/L em 48 h de cultivo, representando uma produtividade de 56,3 U/L.h⁻¹, valor esse muito semelhante ao obtido nesse trabalho.

Tabela 4.7 – Atividades volumétricas (U/L) e produtividades (U/L.h⁻¹) de CGTase produzida por *Paenibacillus* sp. F37 a 37°C, pH 9,0*, 16 h, 120 rpm.

Cultivos	Atividade (U/L)	Produtividade (U/L.h ⁻¹)
1	821	51,3
2	803	50,2
3	770	48,1

*No cultivo 1 o pH do meio foi ajustado inicialmente para 9,0; nos cultivos 2 e 3 o meio de produção foi preparado em tampão tris-HCl 0,1 M, pH 9,0.

E ainda, BONILHA *et al.*, 2006, obtiveram com o cultivo de *Bacillus licheniformis* uma atividade volumétrica de CGTase de 162 U/L, representando uma produtividade de 13,5 U/L.h⁻¹. ALVES *et al.*, 2002, obtiveram com o cultivo de *Bacillus firmus* atividade volumétrica de 550 U/L em 120 h de cultivo, representando uma produtividade de 4,6 U/L.h⁻¹.

Por meio dessas comparações, conclui-se que *Paenibacillus* sp. F37 apresenta uma boa produtividade volumétrica de CGTase, mostrando-se um microrganismo promissor na produção dessa importante enzima industrial.

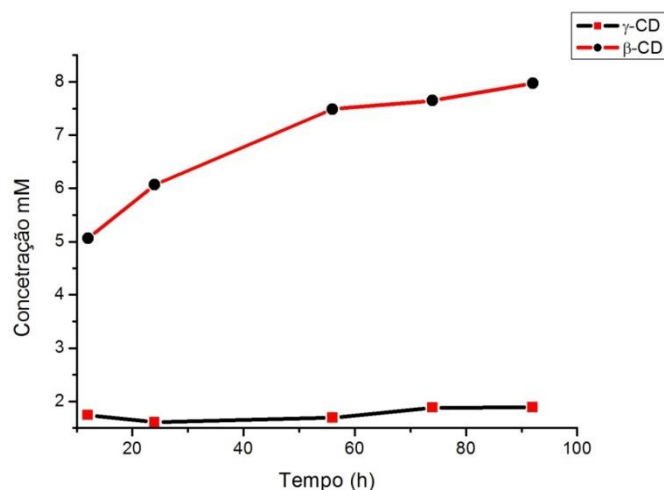
4.8.6 Quantificação de α -CD, β -CD e γ -CD

Ao longo das últimas décadas muitos métodos cromatográficos têm sido utilizados na caracterização de CDs, desde o mais simples como a cromatografia de camada delgada para identificação qualitativa e determinação semiquantitativa das CDs até o mais preciso, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994). Por exemplo, SATO *et al.* (1985) desenvolveram uma metodologia para quantificação de CDs através de CLAE, utilizando uma coluna Shodex RSpak DC-613 (Styrene divinylbenzene

copolymer sulfo (Na^+), 6 mm ID x 150 mm) e acetonitrila e água (65:35) como fase móvel. Essa metodologia serviu de base para a implementação no Laboratório de Tecnologia Enzimática do DEQ UFSCar de uma metodologia para quantificação de CDs por CLAE.

A ação da enzima CGTase sobre o amido catalisa a produção de uma mistura de CDs, sendo uma produzida majoritariamente. De acordo com a CD produzida em maior quantidade, a enzima é classificada como α -, β -, ou γ -CGTase. Trabalhos reportados na literatura mostram que CGTase produzida por *Paenibacillus* é preferencialmente produtora de β -CD, sendo assim classificada como uma β -CGTase. A fim de classificar-se a CGTase produzida por *Paenibacillus* sp. F37, ensaios de produção de CDs foram realizados em reator batelada, termostaticado a 50°C , usando solução de dextrina 50 g/L, pH 8,0 como substrato. A formação de β - e γ -CD foi monitorada ao longo da reação por dosagens colorimétricas, e as CDs totais produzidas ao final da reação foram quantificadas por cromatografia líquida. A Figura 4.15 mostra os perfis de produção de β - e γ -CD.

Figura 4.15 – Produção de CDs a 50°C , usando como substrato solução de dextrina 50 g/L, preparada em tampão tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, 92 h de reação, 10 mL de extrato enzimático (~ 800 U/L), razão enzima/substrato $\sim 1,6$ U/g.

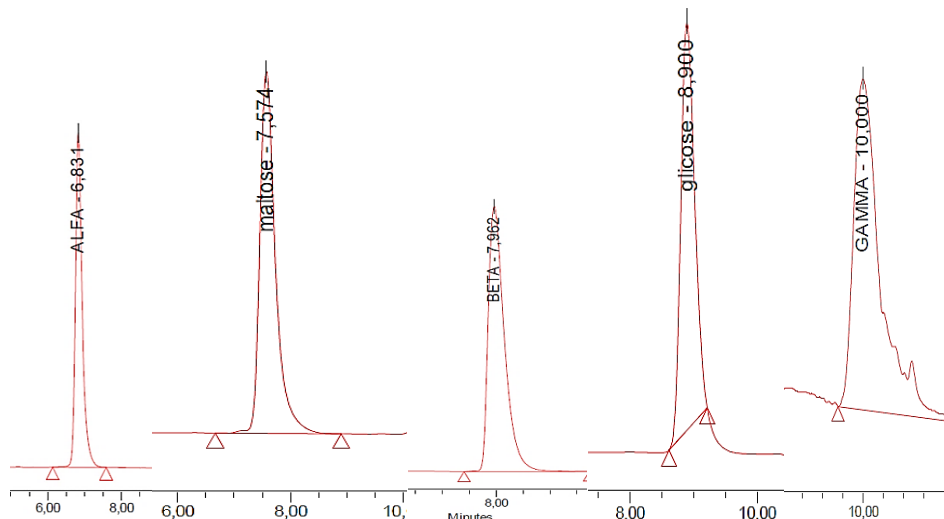


A Figura 4.15 mostra que ao longo da reação de 92 h a enzima produziu preferencialmente β -CD, atingindo ao final da reação 7,9 mM de β -CD, o que corresponde a 8,9 g/L (produtividade de 96,7 mg de β -CD/L.h). A Figura 4.15 também mostra que a produção de γ -CD foi muito baixa, atingindo ao final de reação somente 1,8 mM ($\sim 2,3$ g/L).

A α -CD não é precisamente quantificada colorimetricamente, pois sofre influência de outras CDs. Assim, essa CD foi quantificada somente ao final da reação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

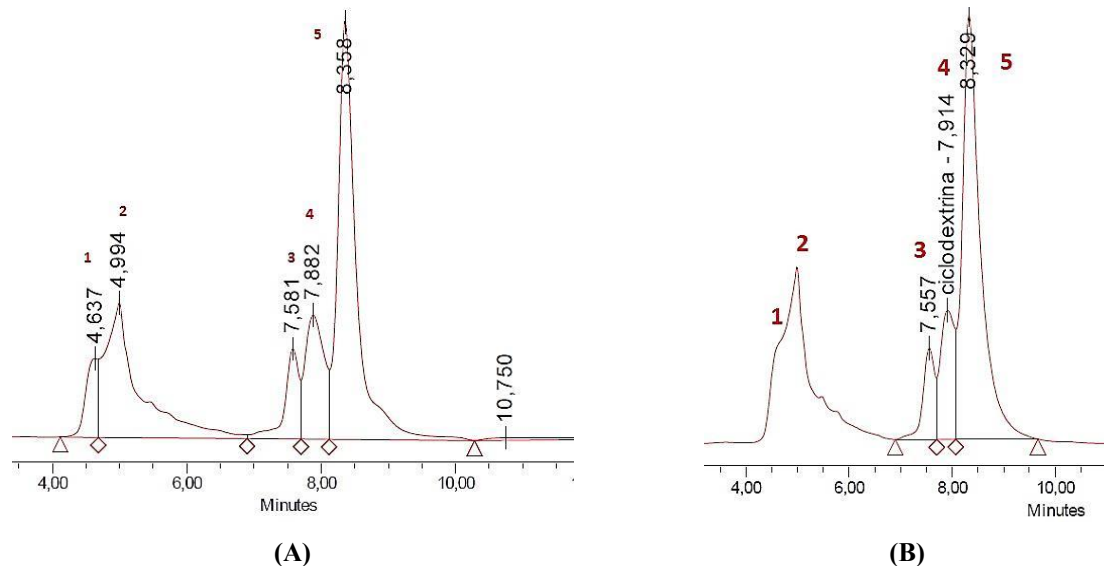
As Figuras 4.16 e 4.17 ilustram os cromatogramas de padrões (α -, β -, γ -CD, maltose e glicose) e do meio reacional de produção de CDs com 92 h.

Figura 4.16 – Cromatogramas de padrões de CDs (α -, β -, e γ -CD, 2g/L), maltose e glicose (2g/L) obtidos por CLAE. Coluna Sugar KS-802 (7 μ m, 8 ID x 300 mm), 80°C, fase móvel água 1 mL/min, detector IR, 45°C



A Figura 4.16 mostra uma boa separação das CDs, bem como dos produtos da hidrólise (glicose e maltose) de dextrinas residuais. Vale ressaltar que o tratamento das amostras com amiloglicosidase (AMG, 1 h, 60°C) auxiliou na quantificação de CDs, pois essa não era possível inicialmente devido à grande interferência das dextrinas residuais. É importante dizer que o tratamento com AMG não causou perda de CDs por hidrólise, devido à especificidade da enzima. AMG atua nas extremidades não redutoras da molécula, hidrolisando-a quase totalmente a D-glicose (SCIPIONI, 2011).

Figura 4.17 - Cromatogramas (duplicata) da amostra final (92 h) de produção de CDs após tratamento com AMG (1h, 60°C) obtido por CLAE, usando coluna Sugar KS-802 (7 μ m, 8 ID x 300 mm), 80°C, fase móvel água 1 mL/min, detector IR, 45°C.



A Figura 4.17 mostra que os picos 3, 4 e 5 apresentaram tempo de retenção semelhante aos dos padrões de maltose, β -CD e glicose. Os picos 1 e 2 referem-se a interferentes. As ciclodextrinas α - e γ -CD, com tempos de retenção de 6,8 e 10 min, não foram detectadas, mostrando que não foram produzidas ou pelo menos se apresentavam em baixíssima concentração. Esse resultado é muito importante, tendo em vista que é de grande interesse do ponto de vista industrial uma CGTase que produza preferencialmente uma CD de interesse, pois isso reduz os custos de purificação do produto final.

A concentração média de β -CD, determinada por CLAE, mostrou-se igual a 9,8 g/L (produtividade de 106,5 mg de β -CD/L.h), desviando-se em menos de 10% do valor obtido pela quantificação colorimétrica desta CD.

A partir desses resultados, pode-se classificar a enzima produzida por *Paenibacillus* sp. F37 como uma β -CGTase. A partir dos resultados de dosagem colorimétrica, a proporção α -: β -: γ -CD foi de 0:1:0,26. Isso indica que no mínimo 74% das CDs produzidas correspondiam a β -CD.

MORIWAKI *et al.*, 2009, classificaram a CGTase de *Bacillus sphaericus* cepa 41 como uma β -CGTase, pois essa produziu CDs na proporção de 0,40:1:0,45 (α -: β -: γ -CD), indicando que do total de CDs produzidas, 54% correspondia a β -CD. SABIONI e PARK, 1992, estudando linhagens do gênero *Bacillus macerans* e *Bacillus alcalofílico* no. 38-2

classificaram as enzimas como α -CGTase (razão $\alpha:\beta:\gamma = 2,7:1:1$) e β -CGTase (razão $\alpha:\beta:\gamma = 1:11:1,5$), respectivamente. Poucas γ -CGTases foram estudadas e caracterizadas, tornando o mercado de γ -CD muito pequeno, devido ao baixo volume de produção e ao alto preço desta CD (KITAYSKA *et al.*, 2011).

5. CONCLUSÃO

Ciclodextrinas tem grande importância no mercado mundial devido às largas aplicações industriais nos setores alimentício, farmacêutico, de cosméticos, química fina, etc. O Brasil é um grande produtor de amido (milho e mandioca), podendo-se inserir num mercado altamente competitivo. Infelizmente, ainda não há plantas instaladas no país para produção industrial desses oligossacarídeos cíclicos. A pesquisa nacional nessa área, no que se refere à descoberta de novos microrganismos produtores da enzima CGTase, minimização de custos de produção de uma CD de interesse, etc., poderia mudar esse atual cenário. Neste contexto, esse trabalho teve por objetivo avaliar o potencial produtor de CGTase a partir de uma linhagem de *Paenibacillus* sp. isolada de solo brasileiro. Duas cepas (F37 e F20) foram avaliadas e, por meio de ensaios preliminares, constatou-se que a cepa F37 poderia ser uma potencial produtora de CGTase.

Selecionada a cepa produtora da enzima, passou-se a investigar as condições de cultivo em meio líquido, desde a reativação do microrganismo até a formulação do meio de produção. Constatou-se vantajosa a eliminação das etapas de reativação e pré-inóculo, reduzindo-se assim o tempo total de cultivo em 72 horas. O pH e o tempo de inóculo e produção foram as principais variáveis avaliadas nesse trabalho. Ao final desse estudo, padronizaram-se as seguintes etapas do cultivo: (1) inóculo sem amido, 37°C, pH 8,0 e 10 h; (2) cultivo na presença de amido solúvel 1% (m/v), preparado em tampão tris-HCl 0,1 M, pH 9,0, 37°C, 120 rpm, 16 h. Essas condições permitiram obter-se uma atividade volumétrica no meio de produção da 800 U/L, correspondendo a uma produtividade de aproximadamente 50 U/L.h⁻¹, valor esse expressivo diante de resultados reportados na literatura.

A caracterização da enzima bruta permitiu verificar que a CGTase de *Paenibacillus* sp. F37 apresenta máxima atividade de ciclização (formação de β -CD) em 50°C, pH 6,0. E ainda, que a enzima apresenta baixa estabilidade nas condições de produção (37°C, pH 9,0), em torno de 3 h de meia-vida, sendo praticamente inativada em 5 horas. Assim, a estratégia de tamponar parcialmente o meio de produção, com o pH iniciando em 9,0 e variando para 6,2 ao final do cultivo, conduziu à maior atividade volumétrica.

A produção de ciclodextrinas em reator batelada (50°C, pH 8,0) utilizando CGTase bruta de *Paenibacillus* sp. F37 como biocatalisador e dextrina 50 g/L como substrato atingiu uma produtividade da ordem de 100 mg de β -CD/L.h. Entretanto, essa produtividade pode ter

um grande aumento otimizando o meio de produção. Por exemplo, conduzir a reação em pH 6,0 e a uma temperatura mais baixa (40-45°C) seria a primeira mudança a ser realizada.

A quantificação colorimétrica de β - e γ -CD, com o auxílio da CLAE, permitiu a classificação da enzima produzida por *Paenibacillus* sp. F37 como uma β -CGTase, produzindo CDs na proporção α -: β -: γ -CD de 0:1:0,26 (~74% das CDs produzida corresponde à β -CD).

Frente a esses resultados e, considerando-se ainda que outras variáveis a serem avaliadas para maximizar a produção de CGTase, conclui-se que *Paenibacillus* sp. F37 é um microrganismo promissor para a produção desta importante enzima industrial.

6. PERSPECTIVAS PARA PESQUISAS FUTURAS

Para dar continuidade ao estudo de otimização do meio de cultivo, visando maximizar a produção de CGTase, sugere-se:

- ✓ Avaliar a presença de íons (cálcio, particularmente) no meio de cultivo;
- ✓ Estudar diferentes fontes de carbono (amidos de diferentes fontes) como indutor da enzima;
- ✓ Analisar a influência do pH ótimo da enzima na produção de CGTase ao longo de cultivo;
- ✓ Estudar diferentes taxas de aeração no meio de cultivo;
- ✓ Purificar a enzima CGTase, por exemplo, por cromatografia de bioafinidade;
- ✓ Imobilizar a enzima purificada visando a sua estabilização;
- ✓ Estudar a produção de β -CD catalisada por β -CGTase de *Paenibacillus sp.* F37 (influência do pH, temperatura e presença de solventes orgânicos);
- ✓ Avaliar a produção de CGTase de *Paenibacillus sp.* F37 em biorreatores aerados (airlift, por exemplo) com células imobilizadas;
- ✓ Considerando que a enzima produza majoritariamente β -CD, avaliar sua purificação por cristalização, visando sua aplicação industrial.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABDEL-NABY, M.A.; REYAD, R.M.; ABDEL-FATTAH, A.F. **Biosynthesis of Cyclodextrin Glucosyltransferase by immobilized *Bacillus amyloliquefaciens* in batch and Continuous Cultures.** Biochemical Engineering Journal, Amsterdam, v.5, p.1- 9, 2000.
- ABELYAN, V.A.; AVAKYAN, A.G.; MELKUMYAN, A.G.; BALAYAN, A.M.; UZUNYAN, L.V; GASPARYAN, A.V. **Comparison of cyclodextrin glycosyltransferases from various groups of microorganisms.** Biochemistry - Moscow (Biokhimiya). v.57, n.3, p. 285-291 (430-437), 1992.
- AGUIAR, C.L. **Ciclodextrina glicosiltransferase, produção, ação e aplicação.** CEPPA, v. 19, p. 119-138, 2001.
- ALVES, L.B.; MATIOLI G.; DE MORAES F.F. **Production of the Enzyme Cyclodextringlycosyltransferase from *Bacillus firmus* Alkalophilic.** Journal Of Inclusion Phenomena And Macrocyclic Chemistry, v. 44, p. 399-402, 2002.
- ALVES-PRADO, H.F.; GOMES, E.; SILVA, R. **Purification and characterization of a cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus campinasensis* H69-3.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 136-140, p.41-56, 2007.
- ALVES-PRADO, H.F. **Estudo da produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por *Bacillus sp alcalofílico*.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, 144f, 2000.
- ALVES-PRADO, H.F. *et al.* **Production of Cyclodextrins by CGTase from *Bacillus clausii* Using Different Starches as Substrates.** Appl Biochem Biotechnol. v.146, p. 3–13, 2008.
- ARMSTRONG, D.W. **Cyclodextrin in Analytical Chemistry.** In: HUBER, O. &SZEJTLI, J. (eds), Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 437-450, 1988.
- ARMSTRONG, D.W., WARD, T.J., ARMSTRONG, R.D.; BEESLEY, T.E. **Separation of Drug Stereoisomers by the Formation of β -Cyclodextrin Inclusion Complexes.** Science, v. 232, p. 1132-1135, 1986.
- AYSE. A.; SEDAT. **A novel thermophilic anaerobic bacteria producing cyclodextrin glycosyltransferase.** Process Biochemistry., Turkey, n. 1, v. 44, p. 36-42, jan. 2009.
- BEKERS, O. *et al.* **Cyclodextrins in the Pharmaceutical Field.** Drug Development and Industrial Pharmacy, v. 17, n. 11, p.1503-1549, 1991.
- BENDER, H. **Production, Characterization, and application of cyclodextrins.**Advances in Biotechnological Processes. v. 6, p. 31-71, 1986.
- BERNA, P. **Estude de purification et de l'interaction de la cyclodextrine glycosyl transferase avec um ligand biospecific et um ligand pseudobiospecificue.** Tese de Doutorado, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, França, 1990.

BLANCO, K.C. **Produção de ciclodextrina glicosiltransferase por *Bacillus sp* subgrupo alcalophilus: Otimização por planejamento experimental.** 2009. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual paulista, Rio Claro, 2009.

BLANCO, K.C. *et al.* **Cyclodextrin Production by *Bacillus lehensis* Isolated from Cassava Starch: Characterization of a Novel Enzyme.** Czech J. Food Sci. n. 3, v. 32, p. 48-53, 2014.

BONILHA, P.R.M. *et al.* **Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus licheniformis*: optimization of production and its properties.** Brazilian Journal of Microbiology. v. 37, p. 317-323, 2006.

BOVETTO, L.J.; BACKER, D.P.; VILLETTE, J.R.; SICARD, P.; JEBOUQUELET, S.J-L. **Cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* E 192.** Biotechnology and Applied Biochemistry. v. 15, p. 48-58, 1992.

CHAROENSAKDI, R. *et al.* **A recombinant cyclodextrin glycosyltransferase cloned from *Paenibacillus sp.* Strain RB01 showed improved catalytic activity in coupling reaction between cyclodextrins and disaccharides.** Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, v. 57, p. 53-59, 2007.

CHAROENSAKDI, R. *et al.* **Cloning and expression of cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Paenibacillus sp.*T16 isolated from hot spring soil in northern Thailand.** Journal of Biochemistry and Molecular Biology, n. 3, v. 40, p. 333-340, 2007.

CITERNESI, U.; SCIACCHITANO, M. **Ciclodextrinas em dermocosméticos funcionais,** Cosmetics & Toiletries, v. 7, p. 50-55, 1995.

COSTA, H. *et al.*; **Structure-functionrelationship in cyclodextringlycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R.** Carbohydrate Research, v. 344, p. 74-79, 2009.

CUCOLO, G.R.; ALVES-PRADO, F.H.; GOMES, E.; SILVA, R. **Otimização da produção de CGTase de *Bacillus alcalophilus* E16 em polvilho doce em fermentação submersa,** São José do Rio Preto, n. 3, v. 9, p. 201-208, jul./set 2006.

CUCOLO, C.R. **Produção de ciclodextrinas a partir de amido de diferentes fontes vegetais e seu emprego na inclusão molecular de aroma cítrico.** 2009. 190f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

DUCHÊNE, D.; DEBRUÈRES, B.; BRÉTILLON, A. **Les cyclodextrines natureles, origine et intérêt en pharmacie galénique.** Labo-Pharma-Probl. Tech., v. 32, p. 843-850, 1984.

DUCHÊNE, D., GLOMOT, F.; VAUTION, C. **Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins.** In: DUCHÊNE, D. (ed), Cyclodextrins and their Industrial Uses, Chapter 6, Paris, France, Editions de Santé, 1987.

ELBAZ, A. F; AHMED, S; AHMED, E. **Purification and characterization of Cyclodextrin B-glucanotransferase from novel Alkalophilic *Bacillus*.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg., Germany, nov. 2014.

FRÖMMING, K.H.; SZEJTLI, J. **Cyclodextrins in Pharmacy**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 1-81, 1994.

GAWANDE, B.N. et al. **Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucoamylase from *Bacillus firmus***. Applied Microbiology Biotechnology, v. 51, p. 504-509, 1999.

GAWANDE, B.N.; SONAWANE, A.M.; JOGDAND, V.V.; PATKAR, A.Y. **Optimization of cyclodextrin glycosyltransferase production from *Klebsiella pneumonia* AS-22 in batch, fed-batch, and continuous cultures**. Biotechnology Progress., v. 19, p. 1697-1702, 2003.

GAWANDE, B.N.; PATKAR, A.Y. **Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumonia* AS-22**. Enzyme and Microbial Technology., n. 9-10, v. 28, p. 735-743, 2001.

GOH, K.M.; MAHADI, N.M.; HASSAN, O.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; ILLIAS R.M.D.; **A predominant beta-CGTase G1 engineered to elucidate the relationship between protein structure and product specificity**. Journal of Molecular Catalyses B-Enzymatic, v. 57, n 1-4, p. 270-277, May 2009.

HAUSLER, O.; MULLER-GOYMANN, C.C. **Properties and Structure of Aqueous Solutions of Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin**, Starch, v. 45, n. 5, p. 183-187, 1993.

HERMES, V.S. **Purificação e caracterização de Ciclodextrina Glicosiltransferase produzida por *Sthenotrophomonas maltophilia***. Dissertação (Mestrado em Ciência em tecnologia de alimentos) – Instituto de Ciência e tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto Alegre, 2010.

HIGUTI, I.H. *et al.* **Isolation of alkalophilic CGTase - producing bacteria and characterization of cyclodextrin-glycosyltransferase**. Brazilian Archives of Biology and Technology. v. 46, p. 183-186, 2003.

HORIKOSHI, K. **Production and Industrial Applications of β -Cyclodextrin**, Process Biochemistry, v. 14, p. 26-30, May. 1979.

HORIKOSHI, K. **Enzymology and Molecular Genetics of CD-Forming Enzymes**, In: Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 7-17, 1988.

IBRAHIM, H.M. *et al.* **Enhancement of Cyclodextrin Glucoamylase Production by *Bacillus* G1 using Different Fermentation Modes**. Biotechnology., n. 4, v. 9, p. 506-512, 2010.

JAMUNA, R. *et al.* **Synthesis of cyclodextrin glucoamylase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins**. Applied Biochemistry and Biotechnology. v. 43, p. 163-176, 1993.

JEMLI, S. *et al.* **A β -cyclodextrin glycosyltransferase from a newly isolated *Paenibacillus pabuli* US132 strain: Purification, properties and potential use in bread-making**. Biochemical Engineering Journal, v. 34, p. 44-50, 2007.

JUN, H.K. *et al.*; **Some properties and optimal culture conditions of cyclodextrin glucanotransferase of *Bacillus sp.* S-6 isolated from kimchi.** *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, v. 27, n. 4, p. 609-617, 1998.

KANEKO, T.; KUDO, T.; HORIKOSHI, K. “**Comparison of CD Composition Produced by Chimeric CGTases**”, *Agricultural Biological Chemistry*, v. 54, n. 1, p. 197-201, 1990.

KATO, T.; HORIKOSHI, K. **Cloning and Expression of the *Bacillus subtilis* N^o.313 β -Cyclodextrin Forming CGTase Gene in *Escherichia coli*.** *Agricultural Biological Chemistry*, v. 50, n. 8, p. 2161-2162, 1986.

KAULPIBOON, J. *et al.* **Expression and characterization of a fusion protein-containing cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus sp.*** A11. *Journal of Basic Microbiology*, n. 5, v. 50, p. 427-435, 2010.

KITAHATA, S; OKADA, S. **Action of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus megaterium* strains n^o5 on starch.** *Agricultural and Biological Chemistry*. v. 38, p. 2413, 1974.

KITAYSKA, T. *et al.* **Purification and properties of a new Thermostable cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165, p. 1285-1295, 2011.

KOROLKOVAS, A. **Molecular inclusion and cyclodextrin properties and therapeutic applications.** *Farmalab*, n. 2, 1991.

KUO, C.C. *et al.* **Production of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus sp.* by pH-stat fed-batch fermentation.** *Biotechnology Letters*, 31, p. 1723-1727, 2009.

LARSEN, K.L. *et al.*; **Purification and characterisation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus sp.* F8.** *Carbohydrate Research*, 310, p. 211-219, 1998.

LARSEN, K. L.; ZIMMERMANN, W. **Analysis and characterization of cyclodextrins and their inclusion complexes by affinity capillary electrophoresis.** *Journal of Chromatography A.*, v. 836, p. 3-14, 1999.

LIMA, H.O.S. **Produção de β -ciclodextrina por fermentação e ciclização simultâneas.** Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil, 1996.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. **Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice.** *Int. J. Pharm.*, 225, p. 15-30, 2001.

MÄKELÄ, M.; PAAVILAINEN. S.K; KORPELA. T.K. **Cultural characteristics of an cyclodextrin glucano transferase producing alkalophilic *Bacillus sp.*** In: HUBER, O.; SZEJTLI. J. **Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins.** Dordrecht Kluwer Academic Publishers, 1988. P. 27-31.

MARTINS, R.F.; HATTI-KAUL, R. **A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterisation.** *Enzyme and Microbiol Technology*. v. 30, n. 1, p. 116-124, 2002.

MATHEW S.; ADLERCREUTZ P. **Regioselective glycosylation of hydroquinone to α -arbutin by cyclodextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter* sp.** Biochem Eng J, n. 3, v. 43, p. 528-532, mar. 2013.

MATIOLI, G. *et al.* **Enhancement of selectivity for producing β -cyclodextrin.** Applied Biochemistry and Biotechnology., v. 84-86, p. 955-962, 2000.

MATIOLI, G. *et al.*; **Production and purification of CGTase of *alkalophilic Bacillus* isolated from Brazilian soil.** Appl. Biochem. Biotechnol., v. 70-72, p. 267-275, 1998.

MATIOLI, G. **Seleção de Microrganismo e Caracterização de sua Enzima Ciclodextrina Glicosiltransferase.** 1997. 290 f. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil, 1997.

MENOCCI, V. *et al.* **Cyclodextrin Glycosyltransferase production by new *Bacillus* sp. Strains isolated from Brazilian Soil.** Brazilian Journal of Microbiology., Brasil, v. 39, p. 682-688, nov. 2008.

MORIWAKI, C. *et al.* **A novel cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus sphaericus* strain 41: production, characterization and catalytic properties.** Biochemical Engineering Journal, v. 48, p. 124-131, 2009.

MORIWAKI, C. *et al.* **Production and characterization of a new cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* isolated from Brazilian soil.** Process Biochem., v. 42, p. 1384-1390, 2007.

NAKAMURA, A., HAGA, K.; YAMANE K. **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, p. 9929-9936, 1994.

NAKAMURA, N.; HORIKOSHI, K. **Production of Schardinger β -dextrin by soluble and immobilized cyclodextrin glycosyltransferase of an *alkalophilic Bacillus* sp.** Biotechnol. Bioeng., v. 19, p. 87-99, 1977.

NAKAMURA, N; HORIKOSHI, K. **Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp.** Agric. Biol. Chem., v. 40, p. 753-757, 1976.

NORMAN, B. E.; JORGENSEN, S. T. ***Thermoanaerobacter* sp. CGTase: its properties and application.** Journal for Starch and its Related Carbohydrates and Enzymes, v. 39, n. 2, p. 101-108, 1992.

OLSSON, C; WESTMAN, G. **Direct Dissolution of Cellulose: Background, Means and Applications.** In: VAN DE VEN. T.G.M. **Cellulose Fundamental Aspects.** Intech, 2013. P. 143-178.

ORLANDELLI, R.C. *et al.* **Enzimas de Interesse Industrial: Produção por fungos e aplicações.** Sabios Saúde e Biol., Brasil, v. 7, n. 3, p. 97-109, set-dez. 2012.

PEDERSEN, S. *et al.*; **“A Better Enzyme for Cyclodextrins”**, Chemtech, December, p. 19-25, 1995.

- PEDERSEN, S.; JENSEN, B. F.; JORGENSEN, S. T. **Enzymes from genetically modified microorganisms.** *Genetically Modified Foods*, v. 605, p. 196-208, 1995.
- PINTO, F.S.T. *et al.* **Production of cyclodextrin glycosyltransferase by *alkaliphilic Bacillus circulans* in submerged and solid-state cultivation.** *Bioprocess Biosyst Eng*, v. 30, p. 377-382, 2007.
- PINTO, F.S.T. **Produção de ciclodextrina glicosiltransferase pela bactéria alcalofílica *Bacillus circulans* ATCC 2183: Cultivo em Batelada, Batelada Alimentada e estado semi-sólido.** 2007. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Ciências e tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- PRADO, H.F.A; HILARIO E; SILVA, E.G. **Seleção de Microrganismos Produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) e produção e caracterização da enzima.** *Braz. J. Technol*, n. 98, 2002.
- PSZCZOLA, D.E. **Production and Potential Food Applications of Cyclodextrins,** *Food Technology* , v. 42, p. 96-100,1988
- QI, Q; ZIMMERMANN, W. **Cyclodextrin gluconotransferase: from gene to applications.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, p. 475-485, 2005.
- RAHMAN, K. *et al.* **Molecular cloning of a cyclodextrin gluconotransferase gene from *alkaliphilic Bacillus sp.* TS1-1 and characterization of the recombinant enzyme.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 74-84, 2006.
- ROSSO, A. *et al.* **Rapid affinity purification process for cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*.** *Biotechnology Letters*, v. 27, p. 1171-1175, 2005.
- SABIONI, J.G.; PARK, Y. K. **Production and Characterization of Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus lentus*.** *Starch*, v. 44, n. 6, p. 225-229, 1992.
- SALIPIRA, K. L. *et al.* **Carbon nanotubes and cyclodextrin polymers for removing organic pollutants from water.** *Earth Envir. Sci.*, v. 5, p. 13-17, 2006.
- SALTÃO, R; VEIGA, F. **Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos.** *Coimbra*, v. 37, n 1, p 1-17, jan./abr.,2001.
- SANT'ANNA JUNIOR, G. L. **Produção de enzimas microbianas.** In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). *Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos.* São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 351-362.
- SANTOS, J,B,C; ZANIN, G,M; OLIVO, J,E; **Influence of culture medium pH on the production of CGTase by *Bacillus firmus* Strain No. 37.** *Acta Scientiarum*, v. 35, n. 3, 2013.
- SASWATHI, N. *et al.* **Synthesis of Cyclodextrin Glycosyl Transferase by Immobilized Cells of *Bacillus circulans*.** *Bioprocess Engineering.* New York, v. 12, n. 6, p. 283- 286, 1995.

SATO, M.; YAGI, Y.; NAGANO., H; ISHIKURA, T. **Determination of CGTase from *Bacillus ohbensis* and its optimum pH using HPLC.** Agricultural and Biological Chemistry, v. 49, p. 1189-1191, 1985.

SAVERGAVE, L.S. *et al.* **Production and single step purification of cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic *Bacillus firmus* by ion exchange chromatography.** India, v. 39, n. 3, p. 510-515, 2008.

SCHIMID, G. **Cyclodextrin Glycosyltransferase Production: Yield Enhancement by Over Expression of Cloned Genes,** Tibtech, v. 7, p. 244-248, Sep. 1989.

SCIPIONI, Gustavo. **Otimização de processo de sacarificação de amido de batata (*Solanum Tuberosum* L.) utilizando enzimas amilolíticas.** 2001. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processo) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SCOPES, R.K. **Protein Purification: principles and practice.** 3.ed. USA. Springer, 380p, 1994.

SIAN, H.K.; SAID, M.; HASSAN, O.; KAMARUDDIN, K.; ISMAIL, A.; RAHMAN, R.A.; MAHMOOD, N.A.N.; ILLIAS, R. MD. **Purification and characterization of cyclodextrin gluconotransferase from *alkalophilic Bacillus* sp G1.** Process Biochemistry.v. 40, n. 1-2, p. 1101-1111, 2005.

SILVA, Larissa. **Produção de ciclomaltodextrina-gluconotransferase com *Bacillus firmus* cepa 37 Imobilizado em carvão de osso bovino.** 2014. 134 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U.C. **Biotechnological applications of cyclodextrins.** Biotechnology Advances. v. 20, p. 341-359, 2002.

STARNES, R.L.; FLINT, V.M.; KATKONICIN, D.M. **Cyclodextrin production with a highly thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoaerobacter* sp.** Minutes of the 5th International Symposium on Cyclodextrins. Paris: Editions Santé,. p. 55-61, 1990.

SUNDARARAJAN, P.R.; RAO, V.S.R.; **Carbohydr. Res.**, v. 13, p. 351, 1970.

SZEJTLI, J. **Past, present, and future of cyclodextrin research.** Pure Appl. Chem., v. 76, p. 1825-1845, 2004.

SZEJTLI, J. **Cyclodextrin in Biotechnology, Starch,** v. 38, p. 388-390, 1986.

SZEJTLI, J. **Cyclodextrin Technology** In: Klumer Academic Publishers: Dordrecht, Netherlands, p.79-185, 1988.

SZEJTLI, J. **The cyclodextrins and their applications in biotechnology. In: Carbohydrate Polymers,** v. 12, Elsevier Science Publishers Ltd, p. 375-392, 1990.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. **Molecular encapsulation of natural and synthetic coffee flavor with-cyclodextrin.** Journal of Food Science, v. 51, p. 1024-1027, 1986

TAI, A.; IWAOKA.; Y, ITO.; H. **Highly efficient and regioselective production of an erythorbic acid glucoside using cyclodextrin gluconotransferase**

from *Thermoanaerobacter* sp. and amyloglucosidase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzym, v. 92, p. 19–23, Ago. 2013.

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

TARDIOLI, P.W.; ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. **Production of cyclodextrins in a Fluidized Bed Reactor Using Cyclodextrin-Glycosyl-Transferase**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 84-86, p. 1003-1019, 2000

TARDIOLI, Paulo. **Produção de ciclodextrinas em reator de leito fluidizado com a enzima ciclodextrina glicosiltransferase Imobilizada**. 1998. 194 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1998.

THATAI, A.; KUMAR, M.; MUKHERJEE, K.J. **A single step purification process for cyclodextrin glucanotransferase from a *Bacillus* sp. isolated from soil**. Preparative Biochemistry and Biotechnology, v. 29, n. 1, p. 35-47, 1999.

TONKOVA, A. **Bacterial cyclodextrin glucano transferase**. Enzyme and Microbial technology., v. 22, n. 8, p. 678-686, 1998.

UCHIDA, K.; SUZUKI, Y. **Enzymatic synthesis of a new derivative of thiamin, O-alpha-glucosylthiamin**. Biociences Biotechnology and Biochemistry. v. 62, p. 221-224, 1998.

UITDEHAAG, J.C.M. et al. **Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypical transglycosylase from the α -amylase family**. Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 30, p. 295-304, 2002.

USHARANI, L. **Comparative study of β -Cyclodextrin production from the CGTase producing novel strains-its characterization and host-guest complex formation**. Journal of Drug Delivery and Therapeutics. , India, v. 4, n. 4, p. 77-81, jul. 2014.

VAN DER VEEN, B. A. et al. **Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity**. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1543, p. 336-360, 2000.

VASSILEVA, A. et al. **Continuous cyclodextrin glucanotransferase production by free and immobilized cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783 in bioreactors**. Process Biochemistry, London, v. 40, p. 3290-3295, 2005.

VAUTION, C. et al. **The use of cyclodextrins in various industries**. Cyclodextrins and their industrial uses, Editions de Santé: Paris, 1987.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELATORRES, E.; AGUILAR, C.N.; RÓMEROGOMES, S. J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. **Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation system**. Biochemical Engineering Journal, Amsterdam, v.13, n. 2, p.157-167, mar. 2003.

WANG, Z.; QI, Q.; WANG, P.G. **Engineering of Cyclodextrin Glucanotransferase on the Cell Surface of *Saccharomyces cerevisiae* for Improved Cyclodextrin Production**. Applied and Environmental Microbiology, v. 72, p. 1873-1877, 2006.

WOUESSIDJEWE, D.; DUCHÊNE, D. **Ciclodextrinas: Realidade e possibilidades.** Universidade de Paris, n. 1, v. 10, p. 7-13, 1994.

YAP, P. et al.; **Production of Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) by *Bacillus lehensis* S8 usin Sargo Starch as Carbon Source.** Journal of Biological Sciences n. 7, v. 10, p. 676-681, 2010.

YENPETCH, W. et al.; **Isolation of cyclodextrin production thermotolerant *Paenibacillus* sp. From waste of starch Factory and some properties of the cyclodextrin glycosyltransferase.** Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, n. 3-4, v. 56, p. 377-383, 2006.

YIM, D.G.; SATO, H.H.; PARK, Y.H.; PARK, Y.K. **Production of cyclodextrin from starch by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* and characterization of purified enzyme.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. v. 18, p. 402-405, 1997.