

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

LARISSA ALBUNIO SILVA

**PRODUÇÃO DE CICLOMALTODEXTRINA-GLUCANOTRASFERASE
COM *Bacillus firmus* CEPA 37 IMOBILIZADO EM CARVÃO DE OSSO
BOVINO**

Maringá
2014

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

S586p Silva, Larissa Alburnio
Produção de Ciclomaltodextrina-glucanotransferase com *Bacillus firmus* CEPA 37 imobilizado em carvão de osso bovino / Larissa Alburnio Silva. -- Maringá, 2014.

126 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin.
Coorientador: Prof. Dr. José Eduardo Olivo.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2014.

1. CGTase. 2. CGTase imobilizada. 3. CGTase - Produção. 4. Ciclodextrina - Produção. 5. *Bacillus firmus* - Imobilização - Carvão de osso bovino. I. Moraes, Flávio Faria, orient. II. Zanin, Gisella Maria, coorient, III. Olivo, José Eduardo, coorient. IV. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

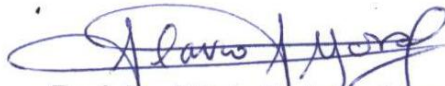
CDD 22.ed. 660.6

SOI-002068

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

Esta é a versão final da Tese de Doutorado apresentada por Larissa Alburnio Silva perante a Comissão Julgadora do Curso de Doutorado em Engenharia Química em 21 de fevereiro de 2014.

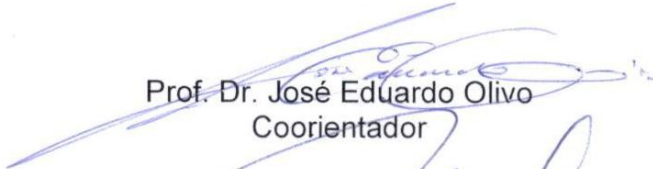
COMISSÃO JULGADORA



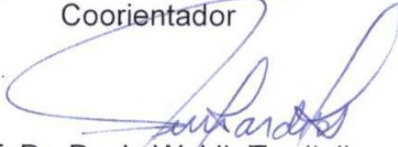
Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Gisella Maria Zanin
Coorientadora



Prof. Dr. José Eduardo Olivo
Coorientador



Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli
Membro



Prof. Dr. Marcos de Souza
Membro



Dr. Cristiane Moriwaki
Membro



Dr. Luiza Pedrina Vilxenski Calsavara
Membro

LARISSA ALBUNIO SILVA

**PRODUÇÃO DE CICLOMALTODEXTRINA-GLUCANOTRANSFERASE COM
Bacillus Firmus CEPA 37 IMOBILIZADO EM CARVÃO DE OSSO BOVINO**

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

Orientador: Prof. Flávio Faria de Moraes, PhD
Coorientadores: Prof^ª. Dra. Gisella Maria Zanin e Prof. Dr. José Eduardo Olivo

Maringá
2014

AGRADECIMENTOS

A caminhada até o momento não foi fácil, tanto na vida acadêmica, quanto pessoal. Muitas mudanças ocorreram, entre idas e vindas de pensamentos, decisões, obstáculos e soluções, mas não posso deixar de agradecer as pessoas que estiveram, estão ou estarão comigo nesta etapa de minha vida.

Primeiramente, devo agradecer a minha família, meu alicerce, especialmente meus pais Luiz e Hilda e minha irmã, Letícia, pois sei que com vocês do meu lado sou mais forte.

Ao meu companheiro Alysson, que sempre me apoia, me incentiva a seguir em frente e lutar na conquista de meus objetivos.

Ao meu orientador professor Flávio Faria de Moraes, que desde o início me acolheu, sempre com muitos ensinamentos, e várias vezes com palavras positivas, impulsionando o trabalho e a auto-estima para cima.

Aos professores José Eduardo Olivo e Gisella Maria Zanin, que sempre me fizeram refletir com suas idéias e me incentivaram a buscar as respostas, contribuindo para o direcionamento da pesquisa.

Ao Departamento de Farmácia, em especial à professora Graciete Matioli, pelo fornecimento do micro-organismo e pela compreensão na manipulação da cepa e no cultivo.

Às alunas de iniciação científica, Bruna Sampaio de Mello e Isabela Berbel Vargas que mesmo com tempo diminuto, me auxiliaram nos experimentos e análise de resultados, contribuindo muito para o desenvolvimento deste trabalho.

A tantos amigos queridos que passaram na minha vida durante esta jornada sempre me transmitindo alegria e me apoiando em momentos difíceis contribuindo para que eu conseguisse mais esta realização profissional e pessoal.

Aos engenheiros Lauro M. Kambara, Luiza P. V. Calsavara e João W. Damasceno e aos técnicos de laboratório, pelo apoio, pelos diversos ensinamentos, pela ajuda na montagem do módulo experimental, nas análises e pelos conselhos.

Ao senhor “Fiore” pelas conversas de otimismo, que sempre me incentivaram a acreditar na caminhada.

À CAPES pelo suporte financeiro, que muito contribuiu para a realização desta pesquisa.

RESUMO

A produção de CGTase foi realizada por células de *Bacillus firmus* cepa 37, livres no meio de reação num biorreator batelada e também por células imobilizadas em carvão ativado de osso bovino, um suporte inovador para esta aplicação, o qual foi utilizado numa coluna de leite fluidizado jaquetada, com recirculação de fluido para controle da temperatura. Um planejamento experimental foi desenvolvido com três quantidades de carvão de osso bovino (3,5; 7 e 14 g) e três taxas de aeração (0,5; 1 e 2 v/v/m). O uso de carvão ativado de osso como suporte, a aeração do meio de fermentação e a coluna de leite fluidizado contribuíram para uma maior produção da enzima, pois as atividades enzimáticas encontradas foram as maiores em comparação com o bacilos livre. Ao fim de 120 h de ensaios de produção a partir de 7 e 14 g de carvão de osso e taxa de aeração de 2 v/v/m a atividade de CGTase obtida foi de 2,5 U/mL. Além disso, verificou-se no que a quantidade intermediária de carvão de osso (7 g) utilizando a máxima taxa de aeração (2 v/v/m), foi o ensaio que obteve valores de atividade de CGTase mais significativos, ou seja, atividade enzimática de 1,75 U/mL em 96 h. Em contraste, para os ensaios utilizando o micro-organismo livre no meio de reação e sem aeração, a atividade encontrada foi de 0,7 U/mL, após 96 h de produção. Portanto, concluiu-se que tanto a aeração, a imobilização do micro-organismo em carvão de osso e, o biorreator de leite fluidizado, foram fundamentais para aumentar a produção de CGTase. Um modelo estatístico de segunda ordem indicou que se as variáveis independentes (quantidade de carvão de osso e a taxa de aeração) fossem aumentadas, o valor da atividade enzimática também seria maior, para um cultivo de 120 horas. No entanto, um ensaio utilizando 28 g de carvão de osso e 4 v/v/m, não conduziu ao aumento da atividade enzimática, que se manteve em 2,5 U/mL, mas mostrou uma diminuição no tempo de produção da enzima que foi reduzido a 60 h. Este estudo demonstrou a possibilidade de produção de CGTase com o *Bacillus firmus* cepa 37 imobilizado em carvão ativado de osso bovino e mostrou valores elevados de atividades enzimáticas de CGTase, em comparação com outras matrizes de suporte citadas na literatura.

Palavras-chave: Produção. CGTase. *Bacillus firmus*. Imobilização. Carvão de osso bovino.

ABSTRACT

The production of CGTase was performed by cells of *Bacillus firmus* strain 37 free in the reaction medium in a batch bioreactor and also by cells immobilized activated bovine bone char, an innovative support for this purpose, which was used in a jacketed fluidized bed column with fluid recirculation and temperature control. An experimental design was developed with three quantities of bovine bone char (3.5, 7 and 14 g) and three aeration rates (0.5, 1 and 2 v/v/m). The use of bone char as support, aeration of the fermentation medium and the fluidized bed column contributed to a higher production yield of the enzyme, because the enzyme activities found were the highest compared with free cell. At the end of 120 h of production assays using 7 and 14 g of bone char and aeration rate equal to 2 v/v/m the CGTase activity obtained was equal to 2.5 U/mL. Furthermore, it was found that the amount of the intermediate bone char (7 g) using the maximum rate of aeration (2 v/v/m), the test was that the most significant values obtained CGTase activity, i.e., enzyme activity of 1.75 U/mL at 96 h. In contrast, for the assays using the microorganism free in the reaction medium or without aeration, the activity was found to be 0.7 U/mL after 96 h of production. Therefore, it was concluded that both aeration, the immobilization of the microorganism on bone char and the fluidized bed bioreactor were instrumental in increasing the production of CGTase. A statistical model of second order revealed that the independent variables (aeration rate and amount of bone char), the values of the enzymatic activity for the cultivation of 120 h. However, an assay using 28 g of bone char and 4 v/v/m, did not increase the activity, which remained at 2.5 U/mL, but showed a reduction in the enzyme production time that was halved to 60 h. This study has demonstrated the possibility of producing CGTase using *Bacillus firmus* strain 37 immobilized activated bovine bone char and showed relatively high values of CGTase enzyme activities, compared to other support matrices.

Keywords: Production. CGTase. *Bacillus firmus*. Immobilization. Bovine bone char.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Representação espacial de CGTase. Verde, verde amarelado, azul, rosa e laranja indicam domínios A, B, C, D e E da enzima, respectivamente. Cilindros vermelhos e fitas amarelas representam α -hélices e β -filamentos (Ohdan *et al.*, 2000).----- 22
- Figura 2 - Representação esquemática das reações catalisadas pela CGTase (KELLY *et al.*, 2009).----- 23
- Figura 3 - Estruturas da α -, β - e γ -CDs (adaptado de SZEJTLI, 1988; VENTURINI *et al.*, 2008).----- 30
- Figura 4 - Estrutura da α -CD e formação do complexo de inclusão (adaptado de VALLE, 2004).----- 31
- Figura 5 - Mecanismo de funcionamento de CDs na aplicação de perfumes, aromas ou fragrâncias e na remoção de odores em tecidos têxteis (ANDREAUS *et al.*, 2010). ---- 33
- Figura 6 - Métodos de imobilização celular de micro-organismos, em que: A= imobilização na superfície do suporte; B= aprisionamento em matriz porosa; C=floculação celular (formação de agregados); D= aprisionamento em microcápsulas ou em membranas. Adaptado de Covizzi *et al.* (2007).----- 40
- Figura 7 - Desenvolvimento de biofilme. (a) Colonização primária; (b) crescimento, e produção de EPS (exopolímero); (c) coadesão de células individuais, coagregadas e grupos de células, originando biofilme jovem, de múltiplas espécies; (d) maturação e formação de mosaicos clonais no biofilme maduro (CORREIA, 2010). ----- 45
- Figura 8 - Microfotografia de carvão de osso bovino granular (Guedes *et al.*, 2005).----- 50
- Figura 9 - Transferência gasosa em reatores trifásicos. Adaptado de Nicolella *et al.* (1999). 53
- Figura 10 - Organograma do projeto de pesquisa.----- 55
- Figura 11 - Organograma do projeto de pesquisa.----- 65
- Figura 12 - Difração de Raios X do carvão de osso bovino.----- 73
- Figura 13 - Dados de velocidade superficial do fluido (meio de produção) usado para a fluidização das partículas de carvão ativado de osso e sua correspondente porosidade do leito fluidizado, aos quais foi ajustada a correlação de Richardson e Zaki (1954). Leito expandido (A) e Leito fluidizado (B).----- 76
- Figura 14 - Adsorção enzimática no carvão ativo de osso: Atividade de CGTase (círculo) e atividade específica de CGTase (losango) em função do tempo de produção da enzima. 79
- Figura 15 - Atividade de CGTase (círculo) e concentração celular (quadrado) em função do tempo de produção enzimática, com células livres no meio do *B. firmus* em agitador orbital. ----- 81
- Figura 16 - Atividade de CGTase (círculo) e atividade específica de CGTase (losango) em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado no carvão de osso, em cinco bateladas repetidas de 48 h, sendo que de 0 a 48 h perfaz a 1ª batelada, de 60 a 96 h a 2ª batelada, e assim sucessivamente. ----- 83
- Figura 17 - Atividade de CGTase (círculo), pH (triângulo) e concentração de açúcares redutores totais (quadrado) em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado no carvão de osso, em cinco bateladas repetidas de 48 h, sendo que de 0 a 48 h perfaz a 1ª batelada, de 60 a 96 h a 2ª batelada, e assim sucessivamente. ---- 85

- Figura 18 - Atividade de CGTase (círculo) e atividade específica de CGTase (losango) em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado no carvão de osso.----- 87
- Figura 19 - Atividade de CGTase (círculo), pH (triângulo) e concentração de açúcares redutores totais (quadrado) em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado no carvão de osso. ----- 88
- Figura 20 - Atividade de CGTase em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 3,5 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m. - 90
- Figura 21 - Atividade de CGTase em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 7 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m. --- 90
- Figura 22 - Atividade de CGTase em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 14 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m. -- 91
- Figura 23 - Atividade específica de CGTase em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 3,5 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m.----- 94
- Figura 24 - Atividade específica de CGTase em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 7 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m.----- 95
- Figura 25 - Atividade específica de CGTase em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 14 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m.----- 95
- Figura 26 - Concentração de açúcares redutores totais e pH em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 3,5 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m.----- 96
- Figura 27 - Concentração de açúcares redutores totais e pH em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 7 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m.----- 97
- Figura 28 - Concentração de açúcares redutores totais e pH em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 14 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m.----- 97
- Figura 29 - Análises de microscopia eletrônica de varredura (x 1000) das partículas de carvão de osso sem células microbianas imobilizadas (A); Carvão de osso com células microbianas imobilizadas em diferentes taxas de aeração: 0,5 v/v/m (B); 1 v/v/m (C) e 2 v/v/m (D).----- 98
- Figura 30 - Efeito da quantidade de carvão e da taxa de aeração na atividade de CGTase produzida por *B. firmus* cepa 37 imobilizado em carvão de osso, baseado nos resultados do planejamento 3².----- 102
- Figura 31 - Superfície de resposta mostrando o efeito simultâneo da quantidade de carvão e da taxa de aeração na atividade de CGTase, baseado nos resultados do planejamento 3². - 102
- Figura A. 1 - Ajuste dos dados de absorvância a 550 nm em função da concentração de β -CD em mM.----- 121
- Figura A. 2 - Reta ajustada para a determinação da curva de calibração de proteína. ----- 122

Figura A. 3 - Reta ajustada para a determinação da curva de calibração de glicose e frutose.

----- 123

Figura A. 4 - Ajuste dos dados de absorvância a 660 nm em função da concentração de celular (g/L) de *Bacillus firmus* cepa 37. ----- 124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resumo de alguns trabalhos publicados sobre produção de CGTase, utilizando-se micro-organismo livre no meio de cultura.-----	26
Tabela 2 - Comparação entre adsorções física e química em imobilização celular.-----	41
Tabela 3 - Trabalhos publicados na área de produção de CGTase, com <i>Bacillus</i> imobilizados e os suportes utilizados. -----	47
Tabela 4 - Trabalhos publicados na área ambiental, com imobilização de micro-organismos e os suportes utilizados. -----	48
Tabela 5 - Especificações do carvão ativado de osso bovino. -----	50
Tabela 6 - Abertura das malhas das peneiras utilizadas na análise do diâmetro médio de carvão de osso. -----	58
Tabela 7 - Caracterização do carvão ativado de osso bovino. -----	74
Tabela 8 - Velocidade superficial do meio de produção (u) em função da porosidade do leito fluidizado (ϵ).-----	75
Tabela 9 - Comparação entre os valores experimentais e teóricos dos parâmetros u_t , u_{tc} , u_{mf} e n .-----	77
Tabela 10 - Planejamento de experimento com duas variáveis independentes: quantidades de carvão de osso e taxas de aeração e três níveis e a variável resposta: atividade de CGTase. -----	99
Tabela 11 - Análises de variância (ANOVA) dos efeitos da quantidade de carvão de osso e da taxa de aeração na atividade de CGTase baseada no modelo quadrático. -----	100
Tabela 12 - Análise estatística dos efeitos estimados do planejamento de experimentos 3^2 . 101	101
Tabela A. 1 - Absorvâncias a 550 nm para diferentes concentrações de β -CD. -----	121
Tabela A. 2 - Absorvâncias a 625 nm para diferentes concentrações de proteína albumina. -----	122
Tabela A. 3 - Absorvâncias a 600 nm para diferentes concentrações da solução de glicose e frutose.-----	123
Tabela A. 4 - Dados da Curva de Calibração de Concentração Celular-----	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	- atividade de CGTase ($\mu\text{mol } \beta\text{-CD} / \text{min mL}$)
A_R	- área da seção reta do reator (cm^2)
AR	- açúcar redutor
ART	- açúcar redutor total
a	- concentração total de fenolftaleína
ABS	- absorvância da solução de dosagem na presença de CD (FENF+amostra)
ABS_o	- absorvância da solução de dosagem na ausência de CD (FENF+H ₂ O)
$C_{\beta\text{-CD}}$	- concentração de $\beta\text{-CD}$
CDs	- ciclodextrinas
CGTase	- ciclomaltodextrina-glucanotransferase
D	- diluição real do meio enzimático
dp	- diâmetro médio do carvão de osso bovino (mm ou cm)
dpi	- diâmetro das partículas de carvão de osso retidas entre duas peneiras adjacentes (mm)
DRX	- difração de raios x
FENF	- fenolftaleína
H	- altura do leito de partículas de carvão de osso (cm)
k	- constante de equilíbrio
K	- coeficiente angular: inclinação da reta de concentração de CDs produzidas em função do tempo de reação ($(\mu\text{moles CD} / (\text{min mL}))$)
m_a	- massa de água (g)
m_c	- massa de sólido ou massa de carvão de osso bovino (g)
m/v	- massa/volume
n	- coeficiente de expansão
Re_p	- número de Reynolds da partícula
U	- Unidade de atividade de CGTase ($\mu\text{mol produto/minuto}$)
u	- velocidade superficial do meio de produção (cm/s)
u_{mf}	- velocidade mínima de fluidização (cm/s)
u_t	- velocidade terminal do carvão de osso (cm/s)
u_{tc}	- velocidade terminal corrigida do carvão de osso (cm/s)

V_E	- volume da enzima diluída (mL)
V_R	- volume total de reação no tubo de ensaio (mL)
v/v/minuto	- volume de meio/volume de ar/minuto
V_a	- volume total de água (mL)
V_b	- volume total do balão volumétrico aferido (mL)
V_c	- volume da matriz porosa (cm ³)
V_p	- volume total das partículas de carvão de osso (cm ³)
V_{zp}	- volume de vazios do carvão de osso (cm ³)
V_t	- volume total do reator (cm ³)
ξ	- fração mássica das partículas de carvão de osso retidas em cada peneira
ε	- porosidade do leito fluidizado
ε_{mf}	- porosidade do leito na condição de mínima fluidização
ε_p	- porosidade interna do carvão de osso
μ_{meio}	- viscosidade do meio de produção (g/(cm s))
ρ_{meio}	- densidade do meio de produção (g/cm ³)
ρ_a	- densidade da água a 25°C (g/cm ³)
ρ_{ap}	- densidade aparente do carvão de osso (g/cm ³)
ρ_p	- densidade do carvão de osso seco (g/cm ³)
ρ_c	- densidade cristalina ou densidade da matriz porosa (g/cm ³)
ψ	- fator de forma da partícula ou esfericidade
α -CD	- alfa-ciclodextrina
β -CD	- beta-ciclodextrina
γ -CD	- gama- ciclodextrina
α -CGTase	- α -ciclomaltodextrina-glucanotransferase
β -CGTase	- β -ciclomaltodextrina-glucanotransferase
γ -CGTase	- γ -ciclomaltodextrina-glucanotransferase

SUMÁRIO

1. PREFÁCIO -----	16
1.1. INTRODUÇÃO -----	16
1.2. OBJETIVOS DA PESQUISA -----	18
1.3. ESTRUTURA DA TESE -----	19
1.4. CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS DA TESE -----	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	20
2.1. ENZIMAS -----	20
2.2. CICLOMALTODEXTRINA-GLUCANOTRANSFERASE (CGTASE) -----	21
2.3. CICLODEXTRINAS -----	29
2.4. MICRO-ORGANISMOS E MEIOS DE CULTIVO -----	35
2.5. IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE MICRO-ORGANISMOS -----	38
2.5.1. Biofilmes -----	44
2.6. SUPORTES UTILIZADOS NA IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE MICRO-ORGANISMOS -----	46
2.7. REATOR DE LEITO FLUIDIZADO -----	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS -----	55
3.1. MATERIAIS -----	56
3.1.1. Micro-organismo, Meio e Condições de Cultivo -----	56
3.1.2. Imobilização de <i>Bacillus firmus</i> cepa 37 no carvão de osso -----	56
3.1.3. Caracterização do carvão ativado de osso bovino -----	57
3.1.3.1. Difração de Raios X do Carvão de Osso -----	57
3.1.3.2. Diâmetro Médio de Carvão de Osso (d_p) -----	58
3.1.3.3. Densidade cristalina do Carvão de Osso -----	59
3.1.3.4. Densidade aparente do carvão de osso -----	59
3.1.3.5. Porosidade Interna do Carvão de Osso -----	60
3.1.3.6. Densidade do Carvão de Osso Seco -----	60
3.1.3.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) -----	60
3.1.4. Estudo do Leito Fluidizado -----	61
3.1.4.1. Reator de Leito Fluidizado -----	65
3.2. MÉTODOS ANALÍTICOS -----	66
3.2.1. Determinação da concentração de β -CDs -----	66
3.2.2. Determinação da Atividade de CGTase -----	68
3.2.3. Determinação da Concentração de Proteínas Solúveis -----	69
3.2.4. Curva Padrão para a Determinação de Açúcares Redutores -----	70
3.2.4.1. Determinação da Concentração de Açúcares Redutores Totais das amostras -	70
3.2.5. Determinação da Concentração Celular -----	71
3.3. PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS -----	71
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	73
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO CARVÃO ATIVADO DE OSSO BOVINO -----	73

4.2. ESTUDO HIDRODINÂMICO DO REATOR DE LEITO FLUIDIZADO-----	75
4.3. ESTUDO DE ADSORÇÃO DE CGTASE NO CARVÃO ATIVADO DE OSSO BOVINO-----	78
4.4. PRODUÇÃO DE CGTASE COM <i>B. FIRMUS</i> CEPA 37 -----	80
4.4.1. Produção de CGTase com Células Livres de <i>B. firmus</i> cepa 37 -----	80
4.4.2. Produção de CGTase em Bateladas Repetidas com Células Imobilizadas do <i>B. firmus</i> cepa 37 em Carvão de Osso Bovino -----	82
4.4.3. Produção de CGTase em Única Batelada com Células Imobilizadas do <i>B. firmus</i> cepa 37 em Carvão de Osso Bovino-----	87
4.4.4. Estudo de Quantidades de Carvão de Osso Bovino e de Taxas de Aeração para a Produção de CGTase por Células Imobilizadas de <i>B. firmus</i> cepa 37-----	89
4.4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura-----	98
4.4.6. Planejamento Fatorial e Superfície de Resposta-----	99
5. CONCLUSÕES -----	107
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS-----	108
7. REFERÊNCIAS -----	109
8. APÊNDICES -----	121
8.1. CURVAS DE CALIBRAÇÃO -----	121
8.1.1. Curvas de Calibração de β -CD-----	121
8.1.2. Curvas de Calibração de Proteína Solúvel -----	122
8.1.3. Curvas de Calibração de Açúcares Redutores -----	123
8.1.4. Curvas de Calibração de Concentração Celular -----	124
8.2. CÁLCULO DA VELOCIDADE MÍNIMA DE FLUIDIZAÇÃO-----	125
8.2.1. Procedimento para o cálculo dos valores experimentais: -----	125
8.2.2. Procedimento para o cálculo dos valores teóricos:-----	126
9. ANEXO -----	127
9.1. TEORIA DA COMPLEXAÇÃO (TARDIOLI, 1998)-----	127

1. PREFÁCIO

1.1. INTRODUÇÃO

O uso de enzimas em processos industriais tem sido amplamente discutido e cerca de 2500 reações diferentes, catalisadas por enzimas, estão listadas no International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). De acordo com Aguiar (2001), até o mesmo ano foi estimado que 80 % das enzimas eram produzidas por fermentação e muitas destas eram adicionadas em detergentes ou utilizadas no processamento de amido e de produtos lácteos.

Ciclomaltodextrina-glicanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) é uma enzima notável, com um amplo potencial para numerosas aplicações em proteção ambiental, indústrias de alimentos, química e farmacêutica, pois possui a habilidade de formar ciclodextrinas (CDs) a partir do amido, pela reação de ciclização, originando α -1,4-cicloglucanos. O produto enzimático é geralmente uma mistura, incluindo principalmente α -, β - e γ -CD, consistindo de seis, sete e oito unidades de anidroglicose, respectivamente, e mínimas quantidades de CDs maiores, ou com mais unidades (LO *et al.*, 2009; TONKOVA, 1998 ; SZETJLI, 1988).

Uma enzima CGTase que possa produzir predominantemente apenas um tipo de CD tem uma grande importância industrial. A formação eficiente de CDs é determinada pelas características ótimas de atividade e estabilidade da CGTase, frequentemente dependente do micro-organismo produtor da enzima (AI-NOI *et al.*, 2008; BEKERS *et al.*, 1991; KUNAMNENI *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2003a; MORIWAKI *et al.*, 2007b).

CGTases, com diferentes propriedades catalíticas, são produzidas por micro-organismos do gênero *Bacillus*, especialmente cepas aeróbias alcalofílicas, ou seja, com crescimento ótimo em valores de pH acima de 9, com frequência entre 10 e 12. CGTase de bacilo alcalofílico produz principalmente β -CD, sem o acúmulo de α -CD. A purificação de β -CD da mistura reacional é facilitada, devido a baixa solubilidade entre a β -CD em γ -CD (ATANASOVA *et al.*, 2011; BLANCO *et al.*, 2011; MAZZER *et al.*, 2008).

As CDs, sendo produtos cíclicos, possuem uma cavidade interna e, por isso, podem formar complexos de inclusão versáteis com muitos compostos orgânicos e inorgânicos. Devido ao formato de cone truncado das CDs, com uma superfície externa hidrofílica, as CDs são solúveis em água e sua cavidade interna hidrofóbica possibilita às CDs encapsular

diversas moléculas hidrofóbicas ou seus grupos funcionais, mudando as propriedades físicas e químicas das moléculas encapsuladas (ATANASOVA *et al.*, 2011; BEKERS *et al.*, 1991; KUNAMNENI *et al.*, 2007; MORIWAKI *et al.*, 2009). Estas mudanças nas propriedades da molécula complexada podem melhorar a sua estabilidade frente ao calor, reduzir a volatilidade, a sublimação, aumentar a resistência à hidrólise e permitir o controle de odores. Por isso, muitas aplicações industriais são encontradas para as CDs (VALLE, 2004) e outras aplicações poderiam tornar-se viáveis, se o custo de produção da CGTase e das CDs pudesse ser reduzido (BLANCO *et al.*, 2011; CUCOLO *et al.*, 2006; ROSSO *et al.*, 2002).

Acredita-se que o desenvolvimento de novos suportes de imobilização, aliado à utilização de técnicas de biologia molecular e processo contínuo, possam contribuir para o desenvolvimento de novos processos de produção enzimática em larga escala. Como objetivo final, deve-se ter em mente no desenvolvimento destas tecnologias, a criação de processos mais economicamente viáveis (CARVALHO *et al.*, 2006).

Para este trabalho foi estabelecido o objetivo de produzir a CGTase com a célula do bacilo produtor da enzima, na forma imobilizada, ou mais especificamente, estudar a imobilização de *Bacillus firmus* cepa 37 em carvão de osso bovino. Escolheu-se o carvão ativado de osso de origem bovina como suporte de imobilização pela sua principal característica, que é a grande área superficial interna desenvolvida durante a ativação do carvão. Nesta estrutura interna porosa, formada por milhares de poros, classificados em micro, meso e macroporos (BONECHAR, 2011), o micro-organismo pode facilmente se acomodar nos poros maiores, enquanto os menores servem ao transporte das moléculas dos reagentes e produtos (NGANDWE, 2007; POSTMA *et al.*, 2010). Além disso, o carvão de osso tem uma natureza alcalina em meio aquoso, que é condizente com as condições de pH do meio de cultivo de *B. firmus* cepa 37, produtor da CGTase (GUEDES *et al.*, 2007; MATIOLI 1997).

A imobilização do bacilo foi utilizada como uma ferramenta para aumentar a eficiência do processo fermentativo, possibilitando, em princípio, a utilização do biocatalisador por longos períodos, com a finalidade de reduzir os custos de produção, além de poder aumentar a proteção das células contra inibidores e facilitar a separação do biocatalisador da fase líquida (CARVALHO *et al.*, 2006).

Para transformar um processo, que de forma clássica, é tipicamente operado em bateladas de fermentação submersa com células livres, em fermentação com células imobilizadas, o presente trabalho teve ainda o objetivo de produzir a enzima CGTase, em batelada e em reator de leito fluidizado e determinar a atividade enzimática durante o processo.

Este reator foi escolhido por permitir a retenção de grande concentração de biomassa no seu interior, o que melhora o contato biomassa-substrato, permitindo a operação em tempos de residência reduzidos. Além disso, a fluidização reduz ou elimina os problemas de entupimento, facilita a transferência de massa e possui a capacidade de controlar e otimizar a espessura do biofilme, o que possibilita uma boa difusão do substrato para as camadas mais profundas de células imobilizadas (SADER, 2005; FREIRE *et al.*, 2008).

1.2. OBJETIVOS DA PESQUISA

O objetivo geral desta pesquisa foi produzir a enzima ciclomaltodextrinoglucanotransferase em batelada, com biorreator de leito fluidizado, utilizando *Bacillus firmus* cepa 37 imobilizado em carvão ativado de osso bovino.

Os objetivos específicos foram:

- a) Produção de CGTase com *B. firmus* cepa 37 livre em suspensão e em agitador orbital;
- b) Análise da atividade de CGTase e da atividade específica de CGTase;
- c) Avaliação da influência da concentração de proteínas solúveis, de açúcares redutores e do pH do meio na produção de CGTase;
- d) Produção de CGTase em batelada (em circuito fechado), utilizando o biorreator de leito fluidizado com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em carvão de osso bovino, testando diferentes taxas de aeração e quantidades de carvão de osso.

1.3. ESTRUTURA DA TESE

Este trabalho foi dividido em oito capítulos, sendo que este primeiro proporciona uma visão geral do problema, os objetivos a serem atingidos, a forma de abordagem do problema e sua contribuição científica.

No segundo capítulo introduz-se a revisão bibliográfica sobre a enzima CGTase e sua produção, bem como os micro-organismos e os meios de cultivos que podem ser utilizados, as propriedades e as aplicações das CDs que podem ser sintetizadas pela enzima, a importância da imobilização microbiana, as características dos suportes utilizados para esta finalidade e o biorreator empregado.

O terceiro capítulo apresenta a metodologia utilizada no trabalho, incluindo todos os materiais e métodos, com os balanços de massa e cálculos realizados.

O quarto capítulo exhibe as discussões detalhadas dos resultados obtidos e no quinto capítulo as principais conclusões encontradas neste estudo são sumarizadas, e também são apresentadas as recomendações para novos estudos. No sexto capítulo resume-se algumas sugestões para trabalhos futuros.

No sétimo capítulo encontram-se as referências que contribuíram para a fundamentação teórico-prática deste trabalho. E por fim, os Apêndices no oitavo capítulo contêm tabelas e gráficos de curvas padrão e de velocidade mínima de fluidização e no capítulo nove o Anexo com a teoria da complexação.

1.4. CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS DA TESE

As principais contribuições científicas desta pesquisa são a produção da enzima CGTase utilizando um suporte alternativo e inovador para este fim, o carvão ativado de osso bovino, em um biorreator de leito fluidizado, com elevados teores de atividade enzimática.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ENZIMAS

As enzimas são proteínas que possuem ação catalítica, permitindo que uma reação ocorra dentro de limites de temperaturas biológicas, por isso, são chamadas de catalisadores biológicos. Possuem características muito interessantes, como: alto grau de especificidade para com o substrato tornando-as altamente eficientes, isto é, raramente produzem subprodutos. Por serem catalisadores, aceleram a velocidade de reação, isto é, reduzem a energia de ativação sem serem consumidas, por isso reações com enzimas podem ter menores custos e são seguras, quando comparadas com reações que utilizam catalisadores químicos, e também não são tóxicas (BORZANI *et al.*, 2001; DIXON e WEBB, 1979).

Assim, é importante o estudo da cinética enzimática, para compreensão da velocidade das reações das enzimas e os fatores que a influenciam, isto é, concentração de substrato, de produtos, temperatura, pH, entre outros parâmetros. A teoria da cinética enzimática foi desenvolvida em 1913, por L. Michaelis e M. L. Menten, sendo que no modelo proposto as moléculas do substrato passam por uma série de formas geométricas e eletricamente alteradas antes de formarem os produtos da reação e as energias livre dos intermediários, são as etapas determinantes da velocidade de reação. As enzimas têm maior afinidade por estes estados de transição do substrato e esta interação enzima-substrato diminui a energia destes estados de transição críticos, acelerando a velocidade de uma determinada reação (LEHNINGER *et al.*, 1995)

Referente ao mecanismo de ação enzimática, o primeiro modelo proposto foi o modelo denominado chave-fechadura, por Emil Fischer em 1894, em que a enzima se encaixa com o substrato específico em uma região chamada de sítio ativo. Tanto a enzima como o substrato sofrem alteração para a conformação de encaixe, em que o substrato é distorcido para a conformação exata do estado de transição, denominado encaixe de indução, proposto por Koshland em 1958, e ao completar a reação catalítica a enzima libera o produto e retorna à sua forma original. Porém, muitos tipos de moléculas, como os produtos ou o próprio substrato, podem inibir a ação das enzimas, que pode ocorrer na forma de inibição reversível ou irreversível (BORZANI *et al.*, 2001; LEHNINGER *et al.*, 1995).

As enzimas podem ser produzidas por tecidos de organismos diferenciados (células animais e vegetais) e micro-organismos (bactérias, fungos, entre outros) e a produção é realizada, em sua maioria, por fermentação submersa ou ainda por fermentação em estado semissólido. Depois da obtenção da enzima existem várias técnicas empregadas em seu estudo, dependendo se a enzima obtida é intra ou extracelular. Dentre estas técnicas pode-se citar: a análise de velocidade de reação catalítica, análise do equilíbrio de reação, que podem ser feitas por espectrofotometria, fluorescência, titulação e análise radioativa. Outras análises são de reações em alta velocidade (que ocorre na fotossíntese) e a quantitativa da atividade enzimática (BORZANI *et al.*, 2001).

Quase sempre, há a necessidade de purificação ou fracionamento de enzimas, pois muitas vezes encontram-se no extrato enzimático obtido outras enzimas ou substâncias, que não são de interesse. Dentre esses métodos pode-se mencionar: a precipitação por diferença de pH, desnaturação por aquecimento, precipitação com solventes orgânicos ou com sais, por adsorção, por cromatografia (separação que depende da adsorção, troca iônica, afinidade específica, entre outros), eletroforese, cristalização, concentração por evaporação ou congelamento do solvente (BENDER, 1986; BERNA, 1990; HIGUTI *et al.*, 2003; MATIOLI, 2000).

2.2. CICLOMALTODEXTRINA-GLUCANOTRANSFERASE (CGTASE)

CGTase é uma enzima bacteriana que possui massa molecular da ordem de 70 - 78 kD e apresenta uma sequência de aminoácidos, que revela uma similaridade estrutural com a enzima α -amilase, sendo por isso considerada uma enzima da família das amilases. A enzima é composta por uma cadeia única de polipeptídios com aproximadamente 650 aminoácidos, não possui ligações intramoleculares por ligações de dissulfeto, mas necessita de cálcio para manter sua atividade catalítica (CUCOLO *et al.*, 2006; MATIOLI, 2000; MORIWAKI *et al.*, 2007b; PINTO *et al.*, 2007).

Segundo Horikoshi (2004), Leemhuis e colaboradores (2010) e Nakamura e colaboradores (1994), a estrutura tridimensional da CGTase revela cinco domínios de proteínas, designados A-E, possui ainda quatro resíduos aromáticos que são conservados nas CGTases, mas não nas α -amilases. É válido lembrar que a α -amilase e a CGTase possuem uma

atividade catalítica em comum, que é a de quebrar a ligação α -1,4 glicosídica. A estrutura das CGTases de diferentes origens são similares e depende do micro-organismo produtor e conseqüentemente das condições de cultivo, que favorecem o crescimento de um determinado micro-organismo. Na Figura 1 está representada a estrutura da CGTase produzida por *B. circulans* 251 pesquisada por Ohdan e colaboradores (2000).

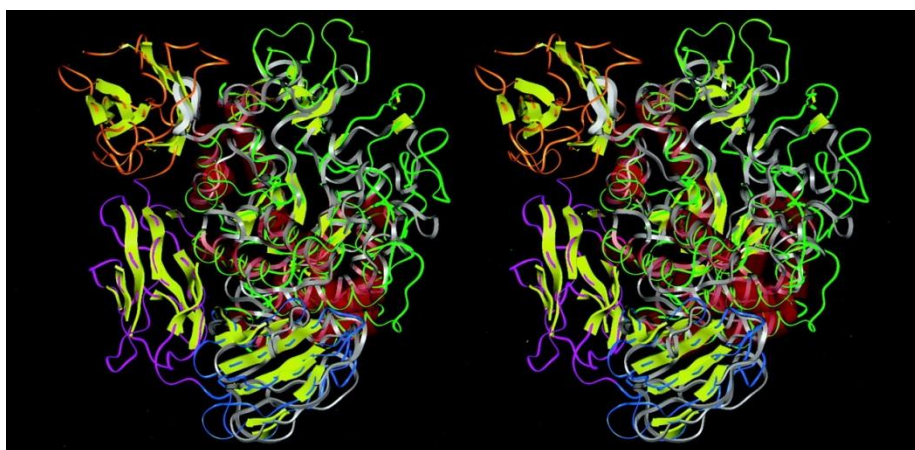


Figura 1 - Representação espacial de CGTase. Verde, verde amarelado, azul, rosa e laranja indicam domínios A, B, C, D e E da enzima, respectivamente. Cilindros vermelhos e fitas amarelas representam α -hélices e β -filamentos (OHDAN *et al.*, 2000).

A CGTase é considerada uma enzima multifuncional, que catalisa quatro reações: ciclização (reação de transglicosilação intramolecular), acoplamento (reação de transglicosilação intermolecular, em que o anel de ciclodextrina é rompido e transferido para aceptores lineares), desproporcionamento (no qual dois oligossacarídeos lineares são convertidos em oligossacarídeos lineares de diferentes tamanhos) e hidrólise do amido (Figura 2) (ATANASOVA *et al.*, 2009; HAMON e MORAES, 1990; KUNAMNENI *et al.*, 2007; MORIWAKI *et al.*, 2009; VASSILEVA *et al.*, 2003). A ciclização ocorre quando a cadeia de oligossacarídeos lineares (amido) é clivada e um novo açúcar redutor terminal é transferido para o açúcar terminal não redutor de mesma cadeia (AI-NOI *et al.*, 2008). Essas reações podem ser realizadas em uma extensa faixa de pH e temperaturas, crescendo portanto, as aplicações industriais da CGTase (PINTO *et al.*, 2007).

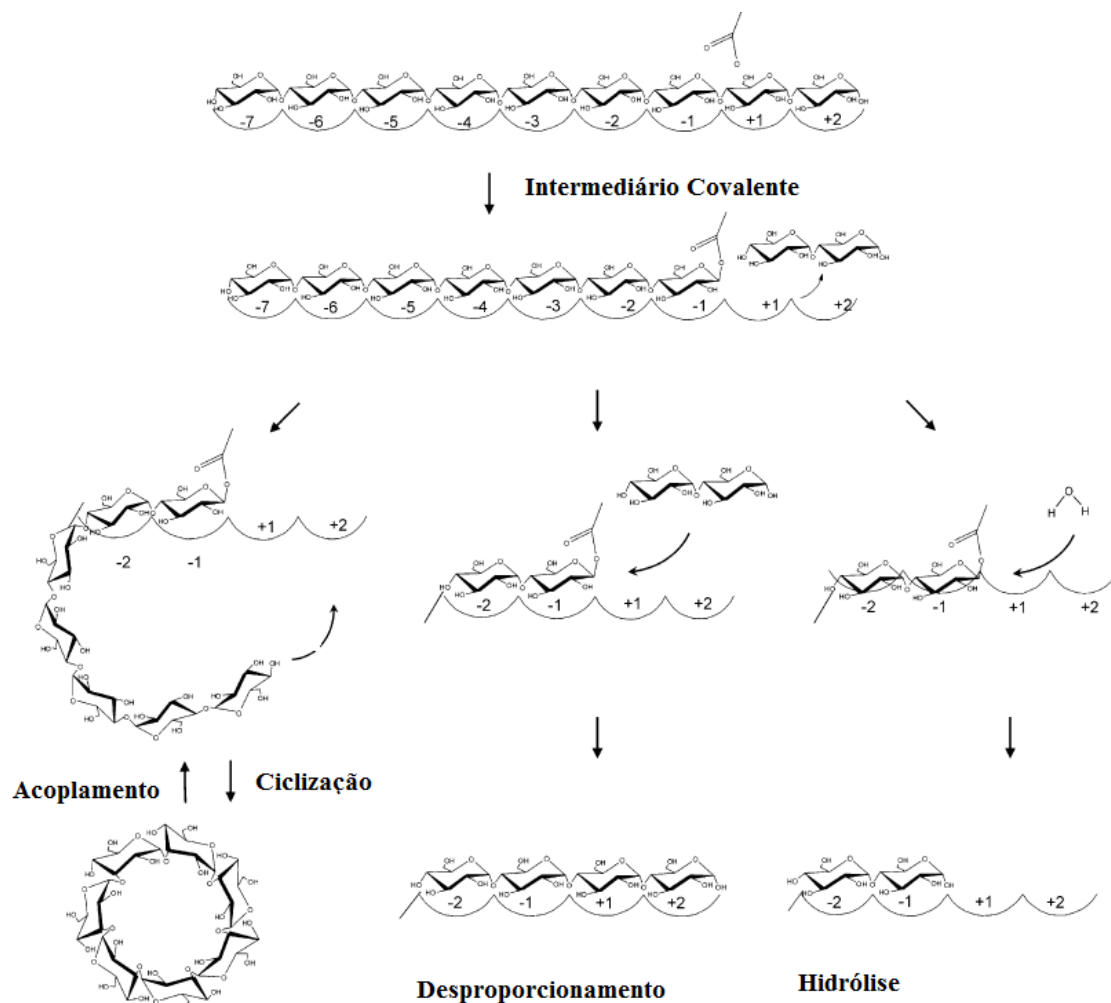


Figura 2 - Representação esquemática das reações catalisadas pela CGTase (KELLY *et al.*, 2009).

Na Figura 2 se observa, de forma esquemática, as reações que a CGTase realiza e que a ciclização é a reação que produz as ciclodextrinas, a partir das cadeias de amido, que devem ter mais que cinco resíduos de glicopiranosil e estarem em sua forma helicoidal. Se a cadeia tiver menos que cinco unidades, porém mais que duas, a CGTase é capaz de sintetizar oligossacarídeos de maior massa molar pela reação de desproporcionamento e então produzir CDs. Por outro lado, a reação de acoplamento é a reação que cliva e abre o anel da CD e faz a transferência de maltooligossacarídeos para as moléculasceptoras, como a maltose. No meio de reação para a produção de CDs, o acoplamento ocorre na presença de CDs e de alguns substratos como, a glicose, maltose e maltotriose. Esta reação pode competir com a ciclização, resultando em rendimentos menores, quando se objetiva a produção de CDs (BENDER, 1986; MATIOLI *et al.*, 2002).

A cinética de reação de CGTase foi estudada por vários autores, como exemplo Villete e colaboradores (1990), que utilizaram na fermentação do micro-organismo *Bacillus circulans* vários substratos (amido de batata, milho, trigo, maltose, glicose, entre outros) e inibidores (glicose, celobiose, sacarose maltose, entre outros.). Eles confirmaram a existência de dois sítios na enzima, um que age como doador e outro como receptor, com características que auxiliam na compreensão das CDs, depois da fase inicial da reação. Eles ainda comprovaram que o sítio receptor apresenta uma grande afinidade para as moléculas com estrutura semelhante às moléculas de amido não-redutoras. Observaram também, que na ausência de receptores, a CGTase não realizava as reações de acoplamento, isto é, não rompia o anel das CDs, porém traços de oligossacarídeos ou de vários receptores adicionados ao meio de produção de CDs, foram suficientes para desencadear a reação de transglicosilação intermolecular (acoplamento).

De acordo com Abdel-Naby e colaboradores (2011) a enzima CGTase (α -1,4-glucano-4-glicosiltransferase) é importante na área industrial, pois catalisa a formação de oligossacarídeos chamados ciclodextrinas (CDs), a partir do amido, e outros carboidratos como amilose, amilopectina e maltooligosacarídeos. Os três tipos mais comuns de CGTases são identificadas como: α -, β - e γ -CGTase, conforme a predominância do tipo de CD produzida, ou seja, α -CGTases produzem principalmente α -CDs, enquanto β - e γ -CGTase produzem β - e γ -CDs, respectivamente. Porém, a predominância de cada CD depende do pH, da temperatura, de sua origem microbiana, ou seja, do micro-organismo produtor da enzima e também do tempo de reação. Em todos os casos, no entanto, tempos prolongados de reação resultam na formação de uma mistura de todos os três tipos de CDs, com β -CD representando o produto de reação predominante (COSTA *et al.*, 2007; LETSIDIDI *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2003a; MAZZER *et al.*, 2008; SZEJTLI, 1988).

Muitos são os parâmetros, que exercem influência na reação enzimática, tais como: pH, temperatura, íons, tempo de reação, concentração de substrato e enzima, cofatores, etc. O tempo de reação é muito importante, pois a velocidade de reação enzimática diminui com o tempo e vários são os fatores que contribuem, como: inibição pelos produtos, consumo de substrato, entre outros, Além disso, a proporção entre as diferentes CDs é dependente do tempo de incubação da enzima no meio contendo amido, isto é, muitas CGTases formam inicialmente α -CD, enquanto a formação de CDs maiores é mais lenta (BEKERS *et al.*, 1991; MATIOLI, 2000).

Entretanto, uma CGTase que produza somente um tipo de CD é industrialmente favorável, pois diminui os custos de purificação do processo (AI-NOI *et al.*, 2008, MORIWAKI *et al.*, 2007b, SIAN *et al.*, 2005). Segundo Martins e colaboradores (2003a), este processo de formação eficiente de CDs é determinado pelas características ótimas de atividade e estabilidade da enzima, que depende com frequência do micro-organismo de origem da CGTase.

A produção de CGTase pelo micro-organismo selecionado depende do controle de parâmetros do meio de cultivo e do ambiente reacional (temperatura, por exemplo), que são fundamentais para alcançar alta produtividade da enzima e, conseqüentemente, ótima produção. Há vários caminhos para se reduzir os custos de produção da CGTase, como a escolha das condições de fermentação, por exemplo, a agitação e a aeração, que podem aumentar a difusão do substrato no meio (BLANCO *et al.*, 2011; ROSSO *et al.*, 2002).

A CGTase é geralmente produzida em cultivos aeróbios submersos e em reator batelada com agitação. O tempo de cultura depende da velocidade de crescimento do micro-organismo, no geral, demora de 2 a 3 dias tanto para os mesófilos como para os termófilos, o que difere são as temperaturas de cultivo, que são de 30 a 37 °C para mesófilos, e superiores a 50 °C para termófilos, e pH que varia de 6 a 10, para ambas as culturas (MATIOLI, 2000).

No sistema em batelada, no qual a composição química do meio de cultivo é praticamente homogênea, é importante considerar o fenômeno de repressão catabólica, ou seja, a síntese de CGTase pode ser reprimida utilizando mono e dissacarídeos como fontes de carbono. Isto é, quando há várias fontes de carbono presentes, o micro-organismo prefere utilizar a que lhe é mais favorável. Uma das formas de evitar este problema é o uso de cultivos em batelada alimentada, no qual o substrato pode ser alimentado em pequenas concentrações. Outra alternativa de produção da enzima é utilizar cultivos no estado sólido, mais semelhantes ao habitat natural de alguns micro-organismos, em que o substrato disponível para as células é controlado pela existência de possíveis gradientes microscópios na massa de células agregadas, ou pelas mudanças na permeabilidade da membrana celular. O cultivo no estado sólido geralmente requer baixo custo de investimento e permite o uso de produtos agroindustriais baratos, como, o resíduo industrial fibroso da soja, derivado do processo de produção da proteína isolada, entre outros (PINTO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2006). Porém, esses dois tipos de fermentações, no estado líquido ou sólido, apresentam

vantagens e desvantagens, a escolha depende de limitações operacionais, desempenho das células e produção enzimática. Na maioria dos artigos na literatura, a produção de CGTase é conduzida em cultivo líquido com micro-organismos aeróbios mesófilos, mas também há relatos de bactérias aeróbias termófilas, anaeróbias termófilas e aeróbias alcalofílicas (ALVES-PRADO *et al.*, 2006; SIAN *et al.*, 2005).

A produção de CGTase a partir de micro-organismos bacterianos foi estudada e relatada por vários autores. A Tabela 1, a seguir, identifica alguns desses autores na literatura, como também a origem da enzima, o tempo em que alcançou a maior produção e, quando possível, a atividade de CGTase e a atividade específica de CGTase.

Tabela 1- Resumo de alguns trabalhos publicados sobre produção de CGTase, utilizando-se micro-organismo livre no meio de cultura.

Micro-organismos	Tempo de Produção (h)	Atividade de CGTase (U ml ⁻¹)	Atividade específica de CGTase (U mg ⁻¹)	Referências
<i>B. pseudocaliphilus</i>	24	0,06	458	Atanasova <i>et al.</i> (2011).
<i>B. lehensis</i>	72	134	N.I	Blanco <i>et al.</i> (2011).
<i>Bacillus G1</i>	144	77	N.I	Ibrahim <i>et al.</i> (2010).
<i>B. alcalophilos</i>	144	0,5 ^{N.U}	21	Geetha e More (2010).
<i>B. sphaericus</i>	144	0,048	0,24	Moriwaki <i>et al.</i> (2009).
<i>Bacillus sp.</i>	20	N.I	0,04	Menocci <i>et al.</i> (2008).
<i>Bacillus sp.</i> 20RF	48	0,22	N.I	Atanasova <i>et al.</i> (2008).
<i>Bacillus sp.</i> 8SB		0,12	N.I	
<i>Bacillus sp.</i> MK6	24	2,5 ^{N.U}	N.I	Ai-Noi <i>et al.</i> (2008).
Cepa Aveia 7	120	N.I	0,19	Costa <i>et al.</i> (2007).
<i>B. firmus cepa 37</i>	120	N.I	79,8	Moriwaki <i>et al.</i> (2007a).
<i>B. licheniformis</i>	12	0,162	0,0129	Bonilha <i>et al.</i> (2006).
<i>PaeniBacillus campinasensis</i>	48	1,34	0,335	Alves-Prado <i>et al.</i> (2006).
<i>B. circulans</i>	30	0,12	N.I	Burhan <i>et al.</i> (2005).
<i>B. alcalophilic CGII</i>	18	88,6	N.I	Freitas <i>et al.</i> (2004).
<i>B. firmus</i>	144	0,195 ^{N.U}	1,47	Higuti <i>et al.</i> (2003).
<i>B. circulans</i> DF 9R	48	5,8 ^{N.U}	N.I	Rosso <i>et al.</i> (2002).

N.I: não informado

N.U: não informado o valor de U

U = μmol de β-CD/min

A Tabela 1 mostra os diferentes trabalhos publicados para a produção de CGTase. Observa-se que os autores utilizam diferentes micro-organismos livre no meio, como também diferentes tempos de produção. A comparação das atividades enzimáticas se torna muito difícil, devido a tantas divergências, além disso, muitas vezes o método de dosagem enzimático também difere. Por isso, a comparação das distintas produções da enzima relacionadas na literatura deve ser minuciosa.

Como mencionado, existem diversos métodos analíticos para determinar a atividade de CGTase, mas devido à presença de outras enzimas no meio, como a α -amilase, não é muito fácil determinar sua atividade. A atividade de CGTase pode ser baseada na formação da CD ou no consumo de amido (SZEJTLI, 1988). Mais genericamente, como a reação catalisada pela CGTase, além de ser reversível, forma simultaneamente oligossacarídeos lineares e cíclicos, é possível definir muitas atividades como: a) atividade de dextrinização ou a medida da degradação do amido; b) atividade de ciclização ou a medida da formação de uma CD; c) atividade de acoplamento ou a medida do consumo de um oligossacarídeo específico, a partir da abertura de uma CD; d) atividade de desproporcionamento ou a medida do consumo de um oligossacarídeo linear, que sofreu uma reação de transglicosilação (HAMON e MORAES, 1990).

A dosagem da enzima CGTase pode ser feita por meio da formação do complexo entre a CD produzida e um corante adicionado, ou seja, o complexo formado produz uma variação da densidade ótica da solução, que pode ser medida por espectrofotômetro. Isto pode ser verificado, quando se utiliza fenolftaleína, já que este indicador na presença de β -CD forma um complexo incolor estável, assim o decréscimo na intensidade da cor da solução contendo este corante é proporcional à concentração de β -CD (HAMON e MORAES, 1990; MATIOLI, 2000).

O método colorimétrico usado na determinação enzimática é eficiente e fácil, para a dosagem das três CDs, α -, β - e γ -CD, mas existe também a determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) das CDs formadas, que se torna um método rápido, quando as condições de leitura estão estabelecidas tais como: velocidade de fluxo, diluições das amostras, curvas padrões, entre outras (SZEJTLI, 1988).

Conforme Pinto e coautores (2011), a otimização das variáveis do processo de produção da CGTase, como a massa de oxigênio transferido, o controle de agitação e aeração, são

importantes para o crescimento microbiano e para a produção enzimática durante a fermentação, elevando a produção de enzima e reduzindo os custos. O método mais comum usado para otimização em bioprocessos pode envolver o estudo de várias variáveis simultaneamente, quantificando seus efeitos e suas possíveis interações. Essas variáveis incluem, como exemplos: taxa de aeração, quantidade de biomassa, tipos e quantidade de substrato (ou seja, origem do amido e estudo de diferentes meios de cultivo e produção), tipo de biorreator, tipo e velocidade de agitação, entre tantos outros parâmetros que podem ser manipulados para aumentar a produção enzimática.

Outro parâmetro importante, no meio de cultivo e produção enzimática é o pH, que na maioria das vezes, possui um valor ótimo, tanto para o micro-organismo produtor como para a enzima produzida. Segundo Dixon e Webb (1979), a existência de um pH ótimo para a maioria das enzimas pode ser resultado, por exemplo, do efeito do pH sobre a afinidade do complexo enzima-substrato, do decréscimo da saturação da enzima com o substrato, do efeito do pH sobre a estabilidade da enzima, entre outros fatores, que normalmente, ocorrem simultaneamente.

Valores de pH muito altos (> 11) ou baixos (< 8) podem causar a variação no estado de ionização da enzima acarretando em sua desestruturação. Pelo fato de as enzimas serem proteínas, o caráter iônico dos grupos amino e carboxílicos da proteína é afetado pelas mudanças de pH. De acordo com Matioli (1997), a enzima CGTase de *Bacillus firmus* cepa 37 mostrou-se estável a 60 °C em pH 8, na presença de íons cálcio. Observa-se, então, que o pH ótimo para a enzima, muitas vezes não é o ideal para o micro-organismo produtor (pH 9-11) e que esta variação entre os pH ótimos do micro-organismo e da enzima pode dificultar a produção eficiente de CGTase.

São vários os métodos de purificação da CGTase, como adsorção em amido, precipitação com sulfato de amônia, cromatografia de troca iônica e por afinidade bioespecífica, ultrafiltração etc. (BENDER, 1986; HIGUTI *et al.*, 2003). Normalmente, a purificação da enzima CGTase envolve vários passos e pode começar com a filtração ou centrifugação do meio de produção, para eliminação das células, posteriormente, concentração do sobrenadante e aplicação da cromatografia de afinidade, seguida por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna trocadora de ânions (MATIOLI, 2000).

Dentre os métodos de purificação de CGTase, o método por cromatografia de afinidade bioespecífica é o mais seletivo, pois existe uma afinidade entre a molécula de interesse e o ligante, que pode ser α , β ou γ -CD, formando um complexo seletivo e reversível (BERNA,1990). Matioli (1997) purificou a CGTase do *Bacillus firmus* cepa 37 por meio da precipitação com sulfato de amônio 80% de saturação, seguida de cromatografia de afinidade bioespecífica e ultrafiltração em microconcentradores. O fator de purificação foi de 157 e o rendimento em atividade de 65,3%. Tardioli (1998) purificou a CGTase Wacker liofilizada e verificou, após a determinação da atividade da solução enzimática final, que o rendimento da purificação obtido foi 72%, com um fator de purificação de 1,2.

Industrialmente, os métodos de purificação de CGTase utilizando a cromatografia de afinidade bioespecífica e a ultrafiltração tornaram-se inviáveis, pois, além do volume produzido em escala industrial ser elevado, são equipamentos onerosos, a não ser que a enzima ou proteína purificada tenha um alto valor agregado, como exemplo a insulina, não se justifica o valor gasto no processo de purificação. Por isso, na indústria o processo de fracionamento com sais e a centrifugação são os métodos mais utilizados. Para o caso da enzima CGTase produzida pelo *B. firmus* cepa 37 estes processos citados resultaram em uma enzima com atividade de 0,408 U/mL ($\mu\text{mol } \beta\text{-CD/mL}\cdot\text{min}$), quando antes a atividade enzimática era de 0,135 U/mL. E ainda, após a produção, concentração e purificação da CGTase, quando seu uso não for imediato, é possível estocar a enzima em agentes conservantes, como o benzoato de sódio 0,1 % (m/v) (MATIOLI, 1997).

2.3. CICLODEXTRINAS

Os estudos envolvendo as CDs têm aumentado vertiginosamente nos últimos anos, devido às suas várias aplicações industriais, que serão vistas nesta seção, e porque elas se tornaram populares em diferentes campos do conhecimento e de aplicação tecnológica (VENTURINI *et al.*, 2008).

As CDs foram descobertas em 1891, quando Villiers reportou seu aparecimento em batatas. Apesar do trabalho pioneiro de Villiers, as CDs foram primeiramente detalhadas por Schardinger em 1903, que descreveu seu processo de preparação e isolamento, por isso também já foram chamadas de dextrinas de Schardinger. Em 1938, Freudenberg confirmou

sua estrutura cíclica e a habilidade de formar complexos de inclusão (AGUIAR, 2001; COSTA *et al.*, 2007; BEKERS *et al.*, 1991; MAZONI *et al.*, 2000).

Apenas a partir de 1970, a possível toxicidade das CDs foi desmentida após estudos toxicológicos adequados, o que motivou um aumento significativo nas pesquisas nesta área. A descrição da estrutura e propriedades das CDs e suas aplicações têm motivado um grande número de pesquisas e publicações neste campo (VENTURINI *et al.*, 2008; SZEJTLI, 1987).

As CDs são maltooligosacarídeos cíclicos, não redutores compostos de 6-60 unidades de glicose ligadas por ligações α -1,4-glicosídicas, sendo que as mais comuns e comercialmente competitivas são as CDs contendo seis moléculas de glicose (α -CD), sete (β -CD) e oito (γ -CD) (Figura 3). As CDs são formadas em presença de amido, pela ação da enzima CGTase (BURHAN *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2003a; MORIWAKI *et al.*, 2007b).

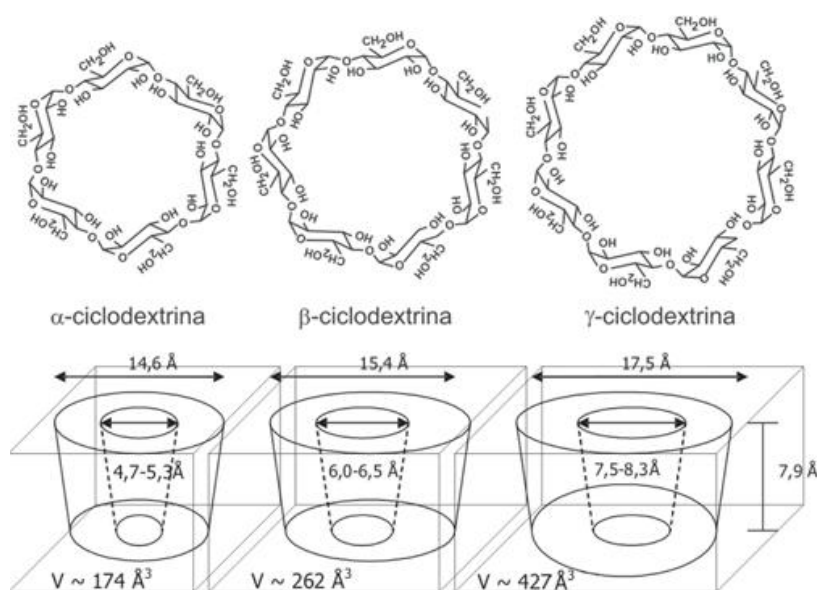


Figura 3 - Estruturas da α -, β - e γ -CDs (adaptado de SZEJTLI, 1988; VENTURINI *et al.*, 2008).

A solubilidade das CDs aumenta rapidamente com a elevação da temperatura, permitindo uma fácil recristalização, quando uma solução concentrada obtida a alta temperatura é resfriada (DUCHÊNE, DEBRUÈRES e BRÉTILLON, 1984). Deve-se destacar

a importância da γ -CD, representada na Figura 3, que apresenta a vantagem de ter maior diâmetro da cavidade e uma solubilidade em água muito maior que a α -CD e a β -CD, pois a γ -CD possui, em maior quantidade, grupos hidroxilas nas extremidades.

A maior cavidade interna da γ -CD permite a complexação de moléculas maiores de grande interesse farmacológico. Essa maior solubilidade em água facilita a preparação de soluções mais concentradas dos princípios ativos de interesse, tornando os medicamentos mais ativos e eficientes (COSTA *et al.*, 2007; KITAYSKA *et al.*, 2011; SZEJTLI, 1988). Já a β -CD é considerada a menos solúvel de todas as CDs. A provável explicação pode ser fundamentada nas ligações químicas existentes na molécula de CD, ou seja, um cinto secundário é formado por ligações de hidrogênio, desenvolvendo uma estrutura rígida estável (FRÖMMING e SZEJTLI, 1994).

Em solução aquosa, as cavidades das CDs não são espaços vazios. Se as cavidades permanecessem vazias, os volumes específicos parciais (volume da massa de um corpo) das CDs, em solução, seriam maiores do que os da glicose ou da maltose, o que não acontece. As cavidades são preenchidas com algumas moléculas de água (Figura 4), enquanto outras se situam externamente às CDs e formam parte integrante da estrutura cristalina (FRÖMMING e SZEJTLI, 1994; MATIOLI, 2000).

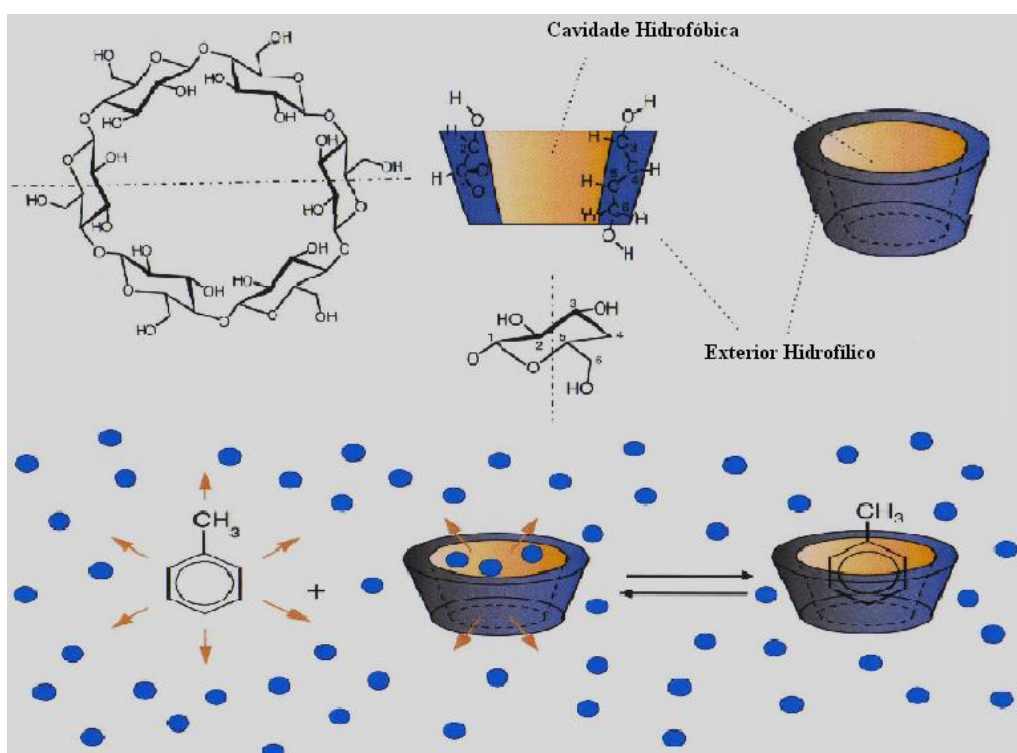


Figura 4 - Estrutura da α -CD e formação do complexo de inclusão (adaptado de VALLE, 2004).

Segundo Valle (2004), a ligação da molécula hóspede com a CD hospedeira não é fixa ou permanente, mas está em um equilíbrio dinâmico. A força da ligação depende da molécula e das interações envolvendo o complexo “hóspede-hospedeira” e do local de interação específico entre os átomos da superfície.

As viscosidades das soluções aquosas de CDs não diferem, significativamente, da viscosidade da água, além disso, as CDs não possuem ponto de fusão definido, mas começam a se decompor a partir de 200 °C (MATIOLI, 2000).

Por outro lado, as CDs, compostas de 5 unidades D-anidroglicano-piranoose, e as maiores, com mais de nove unidades, foram pouco estudadas até o final do século 20, com exceção de poucos artigos. Dentre estes trabalhos está o de Nakamura e colaboradores (1994), em que a CD com 5 unidades (ciclomaltopentaose) foi quimicamente sintetizada, porém suas propriedades físico-químicas e capacidade de formação de complexos de inclusão ainda não foram relatadas (ENDO e UEDA, 2004; QI, MOKHTAR e ZIMMERMANN, 2007).

Diante da necessidade de ampliar as aplicações, aumentar a solubilidade em água e em solventes orgânicos e melhorar a tensão superficial das CDs são feitas alterações estruturais nas ciclodextrinas, que modificam suas propriedades físico-químicas. As alterações que ocorrem nas CDs modificadas, ou derivados de CDs, são reações de substituição dos grupos hidroxila pelo grupo pretendido. Podem-se obter derivados de CDs com grupos metila, etila, carboximetila, entre outros. Por exemplo, a presença de um grupo reativo no derivado da CD permite a fixação permanente da CD sobre superfícies poliméricas como fibras de algodão, papel ou outros polímeros naturais e sintéticos (ANDREAUS *et al.*, 2010; VENTURINI *et al.*, 2008; BERGAMASCO, ZANIN e MORAES, 2007; SALTÃO e VEIGA, 2001).

Uma das áreas de importância da biotecnologia e da bioengenharia é a complexação molecular, que é útil na seleção, separação e solubilização de várias biomoléculas (SINGH *et al.*, 2002 citado por MORIWAKI *et al.*, 2007b). Neste contexto, como já foi mencionado, o arranjo das unidades de glicose na molécula de CD resulta em um formato de cone truncado com a superfície externa hidrofílica. Essa característica torna as CDs solúveis em água, em contrapartida, a cavidade interna hidrofóbica, possibilita que as CDs encapsulem diversas moléculas hidrofóbicas ou grupos funcionais, mudando assim as propriedades físicas e químicas destas moléculas. Portanto, as CDs são capazes de formar complexos de inclusão

com várias moléculas hóspedes (ATANASOVA *et al.*, 2011; BEKERS *et al.*, 1991; KUNAMNENI *et al.*, 2007; MORIWAKI *et al.*, 2009).

Os complexos de inclusão (Figura 5) podem ser formados com uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. Esta propriedade tem sido aproveitada por inúmeras indústrias, tais como a farmacêutica, alimentícia, de cosméticos, têxtil, agroquímica, entre outras, conferindo vantagens aos produtos (ABDEL-NABY *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2007; LETSIDIDI *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2003b; MAZZER *et al.*, 2008). Por exemplo, cita-se o tratamento de águas residuais de indústrias química e farmacêutica, pela conversão de substâncias tóxicas em não tóxicas (complexos com β -CD), resultando em mais rápida eliminação do lodo ativado (VASSILEVA *et al.*, 2003).

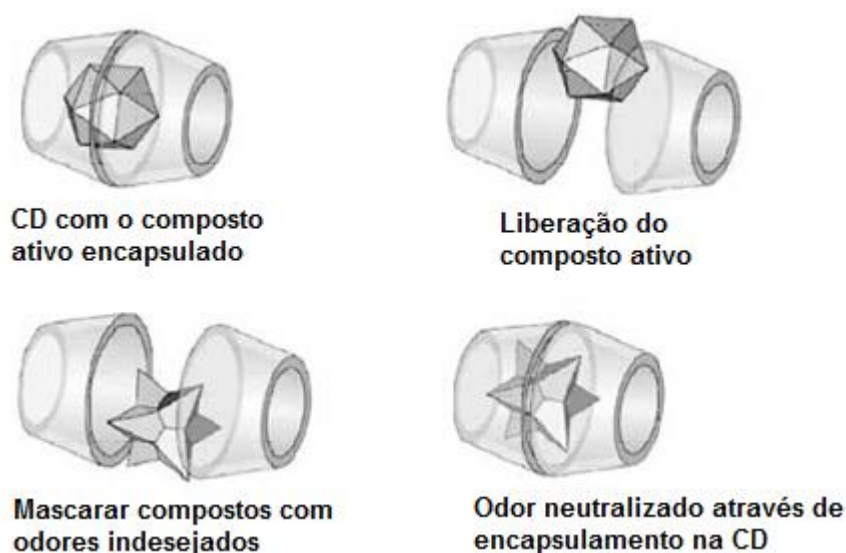


Figura 5 - Mecanismo de funcionamento de CDs na aplicação de perfumes, aromas ou fragrâncias e na remoção de odores em tecidos têxteis (ANDREAUS *et al.*, 2010).

De acordo com Andreaus e colaboradores (2010) uma aplicação da encapsulação de compostos pelas CDs, ocorre na liberação controlada das substâncias. Assim essa liberação deverá ocorrer durante o uso para inibir, por exemplo, o crescimento microbiano, evitar a aproximação de mosquitos ou deixar a roupa perfumada.

A habilidade da CD em formar complexo de inclusão com uma molécula hóspede é função de dois fatores principais. O primeiro é estérico e depende do tamanho da CD em relação ao tamanho da molécula hóspede ou do grupo funcional da molécula hóspede. Se a molécula hóspede tem um tamanho relativamente grande, não caberá adequadamente na cavidade da CD. O segundo fator crítico são as interações termodinâmicas entre os diferentes componentes e o sistema (CD, hóspede, solvente). Para um complexo ser formado, a reação de complexação deve ter energia livre favorável, direcionando o hóspede para dentro da CD (VALLE, 2004).

Na prática, a inclusão pode aumentar a estabilidade da molécula hóspede. Esta estabilidade pode se manifestar como: redução da volatilidade, da sublimação, maior resistência térmica, resistência à hidrólise, resistência à oxidação e aumento da solubilidade de substâncias insolúveis em água (BARÃO, *et al.*, 2013; BERGAMASCO, ZANIN e MORAES, 2005; VALLE, 2004; MATIOLI *et al.*, 2000).

A propriedade de formar complexos de inclusão das CDs tem sido estudada há muitos anos, por autores como Armstrong e coautores (1986); Bender (1986), Duchêne, Debruères e Brétilon (1984), Duchêne (1987) entre outros (principalmente a β -CD) com numerosas aplicações. A formação dos complexos de CDs é usada de forma benéfica em muitas situações, como por exemplo, na redução de volatilização ou estabilização de compostos instáveis (nas indústrias de alimentos e farmacológica); como agentes espessantes; na remoção de colesterol de leite e ovos (indústria de alimentos); na fabricação de perfumes ou substâncias antissépticas (indústria têxtil); intermediário na produção de remédios (indústria farmacêutica); na diminuição da volatilidade de perfumes; na conversão de ingredientes líquidos em sólidos; preservação de fragrâncias (indústria de cosméticos); aumento da solubilidade e estabilidade de anticancerígenos (indústria farmacêutica); imobilização de compostos tóxicos, isto é, metais pesados, tricloroetano para a proteção ambiental, etc. (VALLE, 2004; KITAYSKA *et al.*, 2011; VASSILEVA *et al.*, 2003 e 2005).

As CDs apresentam caráter doce. Uma solução de 2,5 % de β -CD é tão doce quanto uma solução de 1,7 % de sacarose. Portanto, quando a CD for utilizada em processamento de alimentos, seu poder adoçante não deve ser ignorado (SZEJTLI, 1984).

A purificação da mistura das CDs é trabalhosa e de alto custo, e muitas vezes, requer o uso de solventes tóxicos. Portanto, como já foi mencionado, uma enzima CGTase que possa

produzir predominantemente um tipo de CD tem uma significativa importância industrial (KUNAMNENI *et al.*, 2007).

Cucolo e colaboradores (2006) obtiveram maior produção de CDs nos estudos de micro-organismos com boa atividade de CGTase, visando a diminuição dos custos de produção e, portanto, o aumento da disponibilidade de CD para o setor industrial. Os autores ressaltam que a otimização de atividade de CGTase, condições de reação, métodos de recuperação de CDs e purificação de CGTases, podem reduzir os custos de produção substancialmente.

2.4. MICRO-ORGANISMOS E MEIOS DE CULTIVO

As CGTases são produzidas por fermentação submersa utilizando micro-organismos capazes de produzir esta enzima e excretá-la para o meio de produção. Por isso, o uso de micro-organismos como biocatalisadores para obtenção de determinadas substâncias tem suas vantagens, como a alta capacidade de multiplicação e alta flexibilidade de utilização, graças ao seu poder de adaptação às várias situações nutricionais, modificando seu metabolismo de acordo com a oferta de nutrientes do meio (KAWAGUTI e SATO, 2008).

Atualmente há 50 tipos de micro-organismos conhecidos que produzem CGTases específicas e assim CDs específicas. Quinze dessas enzimas foram identificadas nos últimos 2 anos, com uma ampla variação no pH ótimo de reação, temperatura, estabilidade e tamanhos de CDs específicas produzidas. Apesar da disponibilidade de um número grande dessas enzimas, uma CGTase que requeira pouca ou nenhuma engenharia para a otimização industrial, ainda não foi identificada (LEEMHUIS *et al.*, 2010).

Micro-organismos adaptados às condições alcalinas podem ser classificados em dois principais grupos: alcalofílicos e alcalino-tolerantes. O termo alcalofílico é usado para micro-organismos com crescimento ótimo em valores de pH acima de 9, com frequência entre 10 e 12, mas que não podem crescer ou crescem muito lentamente em valores de pH próximos da neutralidade. Micro-organismos capazes de crescerem em valores de pH acima de 9 e 10, mas com taxas de crescimento ótimas próximos da neutralidade ou menores, são ditos como alcalino-tolerantes (ATANASOVA *et al.*, 2008; HORIKOSHI, 1979 e 2004).

A CGTase com diferentes propriedades é produzida principalmente por membros do gênero *Bacillus*, especialmente cepas aeróbias alcalofílicas, nas quais os parâmetros físicos de temperatura e pH são os mais importantes na produção enzimática (PINTO *et al.*, 2007). Bacilos alcalofílicos tem despertado um grande interesse, como *B. firmus* cepa 37, devido à significativa atividade em uma grande escala de pH (acima de 9) e temperatura relativamente alta (em muitos casos acima de 37 °C), usando-se as enzimas que estes micro-organismos produzem em muitas transformações biotecnológicas e industriais (ATANASOVA *et al.*, 2009; ATANASOVA *et al.*, 2011; BLANCO *et al.*, 2011; KUNAMNENI *et al.*, 2007).

Horikoshi (1988) se situa entre os pioneiros da pesquisa sobre a produção de enzimas, a partir de micro-organismos alcalofílicos isolados de solo, que crescem muito bem em meio alcalino. As enzimas obtidas a partir desses micro-organismos, apresentam diferentes propriedades, tais como: estabilidade térmica, pH ótimo, massa molecular e capacidade de formação de CDs. Uma das bactérias alcalofílicas que o autor isolou, produziu preferencialmente β -CD, em quantidades superiores às demais CGTases até então descritas na literatura. Por isso, o mesmo autor em 2004 concluiu que bacilos alcalofílicos são micro-organismos únicos com grande potencial para a exploração da microbiologia e da biotecnologia (HORIKOSHI, 2004).

Bacilos alcalofílicos formam principalmente β -CD, sem acúmulo de α -CD. A γ -CD pode ser separada da β -CD por diferença de solubilidade entre essas CDs, facilitando a purificação da mistura reacional. A maior facilidade de produção industrial da β -CD faz com que esta ciclodextrina tenha um preço mais acessível, quando comparada com as outras CDs (KUNAMNENI *et al.*, 2007; MAZZER *et al.*, 2008).

Alguns autores reportaram também micro-organismos produtores de CGTase que são ditos mesófilos (cultivados em temperaturas de 30 a 37 °C) e termófilos de CGTase (cultivados em temperaturas acima de 50 °C). Nesse grupo de produtores de CGTase incluem: *Klebsiella* sp., *Thermoanaerobacter* sp., *Brevibacterium* sp. *PaeniBacillus* sp. e algumas espécies de bacilos, como o *B. circulans*, *B. macerans*, *B. stearothermophilus*, *B. agaradhaerens* e *B. firmus* (MATIOLI *et al.*, 2000; ALVES-PRADO *et al.*, 2006; BURHAN *et al.*, 2005).

Os meios de cultivo para os micro-organismos produtores de CGTase são bastante complexos e merecem destaque na fermentação, pois sabe-se que o meio de fermentação

(substrato) tem importância crítica, podendo afetar a concentração de produto, produção e produtividade volumétrica (LO *et al.*, 2009).

Estima-se que por volta de 30 a 40 % do custo envolvido na produção de enzimas esteja relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento do micro-organismo e produção enzimática. Portanto, a otimização do meio é também de grande importância para a redução dos custos de produção. Amido e amiláceos foram descritos como os substratos mais adequados para a alta produtividade de amilases, como as CGTases, podendo ser aproveitados resíduos agrícolas ou de processamento de amido, os quais contêm quantidades residuais de amido suficientes para esse fim (CARVALHO *et al.*, 2008).

Um estudo dos diferentes meios de cultivo utilizados para a cultura das várias cepas existentes deve ser realizado, a fim de selecionar os melhores substratos e concentrações para o micro-organismo em estudo, para alcançar a produção enzimática almejada. O substrato usado no cultivo do micro-organismo, que muitas vezes é o mesmo meio usado para a produção de CGTase é o amido, que pode ter diversas origens, como: amido de milho, mandioca, arroz, batata e de trigo. As fontes de proteínas empregadas no cultivo microbiano e também na produção da enzima podem ser: peptonas, extrato de carne, de caseína, de levedura, farinha de soja, água de maceração de milho, entre outros. E ainda, o meio de cultura do micro-organismo e de produção enzimática é composto por sais, dentre eles: K_2PHO_4 , $MgSO_4$, $CaCl_2$, Na_2CO_3 , $CaCO_3$, entre outros. O meio de cultivo Horikoshi II, modificado por Nakamura e Horikoshi (1976), composto por: amido 2,0 %; peptona 0,5 % (peptona bacteriológica ou peptona de carne e de caseína); extrato de levedura 0,5 %; fosfato de potássio 0,1 %; sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,02 %; carbonato de sódio 1,0 %; forneceu uma maior produção de CGTase utilizando o micro-organismo alcalofílico do gênero *Bacillus* sp. (MATIOLI *et al.*, 2000).

Portanto, amido é a principal fonte de carbono utilizada pelos micro-organismos para a produção de CGTase. O propósito dos micro-organismos é consumir o amido para realizar suas funções metabólicas e de reprodução. Já na síntese de CGTase o propósito é converter esse amido em CDs, que podem ser novamente sintetizadas e servir como fonte de nutriente, quando necessário, facilitando o crescimento e a sobrevivência microbiana (WANG *et al.*, 2006).

2.5. IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE MICRO-ORGANISMOS

Já em 1992, no início do desenvolvimento desta área, Webb e Atkinson apresentaram uma definição da imobilização de células como “o confinamento ou a restrição de células a uma determinada região do espaço, de tal maneira que apresentem características hidrodinâmicas que as diferem das células do ambiente circundante”.

Estes autores destacavam que:

“Isto é mais usualmente conseguido aumentando-se significativamente o tamanho efetivo ou a densidade das células, por agregação, ou por fixação destas células a uma superfície de suporte. Assim, células floculadas sob a forma de agregados grandes podem ser consideradas imobilizadas, se os blocos podem ser separados a partir do volume do líquido, por exemplo, por meio de filtros de poros grandes, ou rápida sedimentação. De igual modo, as células que são aprisionadas dentro de uma matriz porosa, de tamanho ou densidade suficientes, e células que estão ligadas a uma superfície sólida, são exemplos de imobilização de células” (WEBB e ATKINSON, 1992).

As células devem manter suas atividades catalíticas em processos de operação contínua ou descontínua, possibilitando sua reutilização. A maioria dos processos fermentativos industriais convencionais utiliza células livres em suspensão, porém o uso de micro-organismos imobilizados permite um aumento da produtividade devido à elevada concentração de células. Por isso, o uso de células imobilizadas tem sido considerado como uma alternativa para aumentar a produtividade global de fermentações, tradicionalmente realizadas com células em suspensão (RAMAKRISHNA e PRAKASHAM, 1999).

Além disso, a dificuldade em se recuperar a enzima do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e frequente inadequação para uso em determinados solventes e em condições de pH, temperatura, e exposição a agentes desnaturantes, podem ser superadas por meio da imobilização celular (CARVALHO *et al.*, 2006). Portanto, a tecnologia da imobilização celular não se restringe à produção de metabólitos extracelulares ou à utilização de micro-organismos como biocatalisadores, mas também possui várias outras aplicações, e na área ambiental, o tratamento de efluentes é uma delas (COVIZZI *et al.* 2007).

O método de imobilização e o tipo de suporte são fatores importantes, que afetam a estabilidade e atividade catalítica dos biocatalisadores (MORIWAKI *et al.*, 2007b). Por isso, existem diversos métodos de imobilização celular que são extensões de métodos desenvolvidos para a imobilização de enzimas. Porém, diferenças importantes entre estes dois biocatalisadores devem ser criteriosamente consideradas, como o tamanho e as exigências fisiológicas das células (BRODELIUS e VANDAMME, 1987; RAMAKRISHNA e PRAKASHAM, 1999).

Conforme sustenta Akin (1987), o método de imobilização deve seguir alguns critérios, como: causar o mínimo de efeitos adversos nas propriedades biocatalíticas desejadas; ser simples e seguro; não requerer muitas etapas e materiais; não gerar subprodutos; possibilitar ampliação de escala; ser adaptável à automação e econômico. Além disso, a matriz utilizada pode romper-se devido ao crescimento celular e à evolução de gases, principalmente por limitações na transferência de oxigênio. Assim, para que a imobilização de micro-organismos apresente sucesso, é necessário escolher adequadamente a metodologia a ser utilizada (COVIZZI *et al.*, 2007).

As técnicas clássicas de imobilização de micro-organismos podem ser classificadas em: a) naturais, as quais incluem a formação de biofilmes e a adesão/adsorção microbiana em suportes sintéticos ou naturais, que ocorrem espontaneamente por meio de interações eletrostáticas e b) química, as quais incluem a encapsulação em matrizes como alginato de cálcio ou uso de agentes ligantes. Nesse caso as células são ligadas às matrizes por ligações covalentes, utilizando-se agentes ligantes como glutaraldeído (COVIZZI *et al.* 2007).

A imobilização natural é considerada uma técnica simples e as condições de realização são suaves; no entanto, como não há barreiras entre as células e a solução, o desligamento e seu religamento são possíveis, devido ao estabelecimento de um equilíbrio entre células adsorvidas e livres em suspensão (KAWAGUTI e SATO, 2008). Ou seja, a imobilização natural de células por adsorção dificulta a ruptura do biocatalisador celular, pois as ligações fracas entre as células e as matrizes resultam em sua dessorção, sem prejuízo para as células e o suporte (ATANASOVA *et al.*, 2009).

Geralmente, a literatura na área de produção da enzima CGTase a partir de biocatalisadores contendo células imobilizadas é escassa e a maioria dos autores utilizam o método de imobilização por aprisionamento celular em diferentes géis tais como: alginato,

ágar, poliacrilamida e criogel de álcool polivinílico. Entretanto, a aplicação do alginato como gel para aprisionamento de bacilos alcalofílico é inadequado, pois a solidificação do gel requer o uso da solução de cloreto de cálcio. Este processo reduz o pH da mistura contendo as células e exerce um efeito negativo no crescimento do micro-organismo. Outros métodos de imobilização, incluindo adsorção e ligação covalente, têm sido usados para obter biocatalisador celular com alto nível de atividade e estabilidade (ATANASOVA *et al.*, 2009).

Dentro deste contexto de técnicas de imobilização natural ou química de células, existem quatro métodos básicos, em que: as células microbianas podem ligar-se à superfície do suporte poroso, ou ficarem aprisionadas no interior desse suporte, ou contidas em membranas e géis ou ainda formarem aglutinados ou agregações celulares, também chamados de floculação. A Figura 6 ilustra esses métodos básicos de imobilização celular.

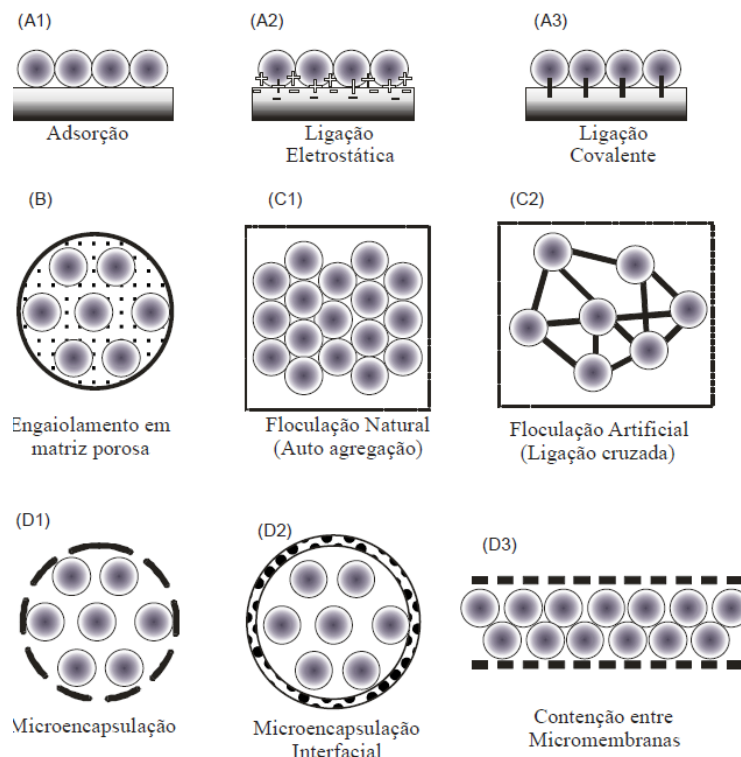


Figura 6 - Métodos de imobilização celular de micro-organismos, em que: A= imobilização na superfície do suporte; B= aprisionamento em matriz porosa; C=floculação celular (formação de agregados); D= aprisionamento em microcápsulas ou em membranas. Adaptado de Covizzi *et al.* (2007).

O método de imobilização por meio de ligação a superfícies pode ser realizado por meio de interações iônicas ou adsorptivas, ou por ligações covalentes entre grupos reativos do suporte e das células. Gonçalves (2006) e Ngandwe (2007) relataram que o fenômeno de adsorção consiste na transferência de massa da fase fluida para a superfície de um sólido usado como adsorvente e que apresentam atrações físicas e químicas. A operação é complexa, pois envolve limitações difusionais, termodinâmicas e cinéticas em uma interface fluido/sólido.

Gonçalves (2006) faz uma comparação entre a adsorção física e química, as ligações envolvidas e as vantagens e desvantagens dessas técnicas de imobilização celular, como ilustra a Tabela 2, a seguir.

Tabela 2 - Comparação entre adsorções física e química em imobilização celular.

Adsorção Física	Adsorção Química
Forças de van der Waals	Forças comparáveis a ligações químicas
Calor de adsorção inferior a 10 kcal/mol	Calor de adsorção superior a 20 kcal/mol
A quantidade adsorvida depende mais do adsorbato do que do adsorvente	A quantidade adsorvida depende tanto do adsorbato como do adsorvente
Especificidade baixa	Especificidade alta
Adsorção apreciável somente abaixo do ponto de ebulição do adsorbato	A adsorção pode ocorrer também a temperaturas elevadas
Energia de ativação baixa	Energia de ativação pode ser elevada
Adsorção possível em multicamadas	Adsorção em monocamadas
Dessorção fácil	A dessorção pode ser difícil ou pode ser acompanhada de transformações químicas

Fonte: Adaptado de Gonçalves (2006).

O método de adsorção é muito usado industrialmente, por exemplo, na adsorção, em leito fixo, de contaminantes de efluentes industriais. O projeto deste leito requer conhecimento da capacidade de adsorção do suporte e da taxa de adsorção. O primeiro passo no projeto é encontrar uma matriz adsorvente com uma alta capacidade, alta seletividade e vida útil longa. Além disso, o adsorvente deve estar disponível em grandes quantidades e ser barato. O segundo passo é escolher um adsorvente que possua uma taxa de adsorção rápida (LEYVA-RAMOS *et al.*, 2010).

Deve-se levar em consideração também, no método de adsorção microbiana, o mecanismo de transporte de massa. Os parâmetros que representam este mecanismo são: o coeficiente externo de transferência de massa na fase líquida, o coeficiente de difusão intrapartícula e a taxa de adsorção em um sítio ativo (CHOY e MCKAY, 2005; LEYVA-RAMOS *et al.*, 2010).

Outro método de imobilização celular é o aprisionamento, baseado na inclusão e retenção de células dentro de uma rígida rede ou interstícios das fibras ou poros do suporte. Isso impede que as células se difundam no meio circunvizinho, sem o comprometimento da transferência de nutrientes e de metabólitos (KAWAGUTI e SATO, 2008). Este método tem sido extensivamente estudado para a imobilização de células viáveis, devido à possibilidade de uso de polímeros hidrofílicos biocompatíveis como suportes de imobilização celular. Além disso, as células imobilizadas em uma matriz hidrofílica podem ser protegidas de condições não adequadas de pH, temperatura, solventes orgânicos e de compostos inibidores presentes no meio de fermentação (CARVALHO *et al.*, 2006).

O método de aprisionamento de células também pode ocorrer em membranas microporosas ou em microcápsulas. Esta técnica de imobilização celular é utilizada quando se requer produto livre de células, mínima transferência de compostos ou quando produtos de alta massa molecular precisam ser separados a partir do efluente. Porém, há algumas limitações da técnica como a transferência de massa, que pode ser diminuída, pelo possível entupimento dos poros da membrana pelo crescimento celular (KAWAGUTI e SATO, 2008).

E por fim, o método de imobilização de células por meio da agregação celular ou a floculação das células, que envolve a auto-agregação de maneira natural ou quimicamente induzida. As células formam aglutinados, isto é, micro-organismos ligados entre si, sem a necessidade de uso de um suporte de imobilização. Esses agregados celulares naturais são geralmente instáveis e sensíveis a tensões de cisalhamento, sendo necessária a adição de agentes químicos que formam ligações cruzadas entre células, como glutaraldeído, durante a imobilização celular (CARVALHO *et al.*, 2006).

Conforme Wang e coautores (2005), o aprimoramento e o desenvolvimento de novas técnicas de imobilização celular, associadas ao uso de novos materiais, têm permitido que os processos fermentativos com células imobilizadas sejam realizados em condições adversas de pH, de esterilidade e agitação. Porém, o processo de imobilização de micro-organismos pode

não ser econômico e as limitações de transferência de massa podem afetar a fisiologia e cinética do crescimento celular.

Segundo Covizzi e colaboradores (2007), todos os métodos de imobilização celular induzem alterações no crescimento, na fisiologia e na atividade metabólica de micro-organismos. Por isso, alguns parâmetros de crescimento celular podem ser modificados pela imobilização dos micro-organismos, ou seja: limitação da transferência de massa por difusão, aumento ou diminuição da tensão superficial, efeito na pressão osmótica, alterações na fisiologia e morfologia celular, aumento ou diminuição da permeabilidade celular, crescimento de populações não-homogêneas, entre outras.

Outras desvantagens da imobilização de células microbianas são: o pequeno volume disponível para a contenção das células imobilizadas, a perda de células para o meio de fermentação, que limitam a quantidade de células imobilizadas nas esferas e a instabilidade dos suportes normalmente utilizados, que limita a utilização dos agregados por longos períodos. Além disso, a imobilização de células por meio de ligações covalentes resulta em uma interação biocatalisador-suporte mais forte, sendo a principal desvantagem o risco de danos à membrana celular (CARVALHO *et al.*, 2006). Ainda, de acordo com Covizzi e colaboradores (2007), uma das desvantagens desta técnica é a formação de biofilmes ou exopolissacarídeos, que podem dificultar as trocas gasosas, entrada de substrato e fluxo de cofatores e produtos do metabolismo microbiano, por isso a escolha do suporte é de grande importância para diminuir essas desvantagens. Os suportes utilizados na imobilização de células de micro-organismos podem ser vistos na Seção 2.6 deste trabalho.

Porém, quando aplicados de maneira correta, os métodos ou técnicas de imobilização celular podem ser utilizados como uma ferramenta para aumentar a eficiência de processos fermentativos, possibilitando a reutilização dos biocatalisadores por longos períodos, estimulando processos contínuos, que podem reduzir os custos de produção, além de poder aumentar a proteção das células contra inibidores e facilitar a separação dos biocatalisadores e recuperação dos produtos da fase líquida (ABDEL-NABY *et al.*, 200; ATANASOVA *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2006; COVIZZI *et al.*, 2007; XIAORAN e ZHONGJIAN, 2007).

Outras vantagens da imobilização de micro-organismos, na produção de enzimas extracelulares, sobre o processo de fermentação convencional utilizando células livres, são: reduzidos riscos de contaminação, fermentação contínua utilizando reatores menos

complexos, eliminação da necessidade de purificação da enzima e produção de enzimas mais estáveis (ATANASOVA *et al.*, 2009; MAZZER *et al.*, 2008; MORIWAKI *et al.*, 2007b; MORIWAKI *et al.*, 2009).

2.5.1. Biofilmes

Os biofilmes, muitas vezes, são formados quando se emprega a imobilização de células de micro-organismos na superfície e nos poros de matrizes ou suportes e apresentam vantagens ou desvantagens na produção de enzimas, que serão vistas nesta Seção.

De acordo com Sader (2005), biofilmes são populações microbianas presas à matriz de polissacarídeos, na qual os micro-organismos podem se aderir uns aos outros e em superfícies ou interfaces. Ou em outras palavras, segundo Correia (2010), os biofilmes são estruturas complexas de células e produtos extracelulares, que se formam aderidas a um suporte.

O processo de formação do biofilme na superfície do suporte é iniciado por células suspensas presentes no meio líquido, que ficam adsorvidas na superfície e depois crescem como biofilme. Como as células suspensas iniciam este processo de formação, a concentração de células no meio tem efeito significativo no início do biofilme, pois possibilita a colonização de um número maior de partículas do suporte (SADER, 2005).

Conforme Xavier e colaboradores (2003), os principais processos envolvidos na formação do biofilme são: transporte e fixação de células livres que estão no meio líquido sobre a superfície do suporte sólido (adesão inicial); crescimento e divisão das células aderidas graças ao consumo de nutrientes do líquido que envolve o biofilme, além da produção e excreção de polímeros extracelulares e, por fim, a perda de células individuais (erosão do biofilme) ou perda de agregados maiores de células.

Portanto, a formação do biofilme envolve uma série de processos físicos, químicos e biológicos, incluindo, dentre outros: a adsorção de moléculas orgânicas sobre uma superfície, o movimento de células para a superfície, a adesão de micro-organismos à superfície, e posteriormente para a primeira camada de células, o acúmulo de biofilme resultante de um crescimento de micro-organismos, e o desprendimento do biofilme. Sabe-se que esse processo é extremamente complexo, e que muitas vezes, dentro de cada etapa, ainda hoje persistem

aspectos obscuros que precisam ser elucidados (FREIRE e PIRES, 2004; MARTINS Jr., 2005). Basicamente podem ser observadas três etapas: adesão, maturação e ruptura, como ilustrado na Figura 7.

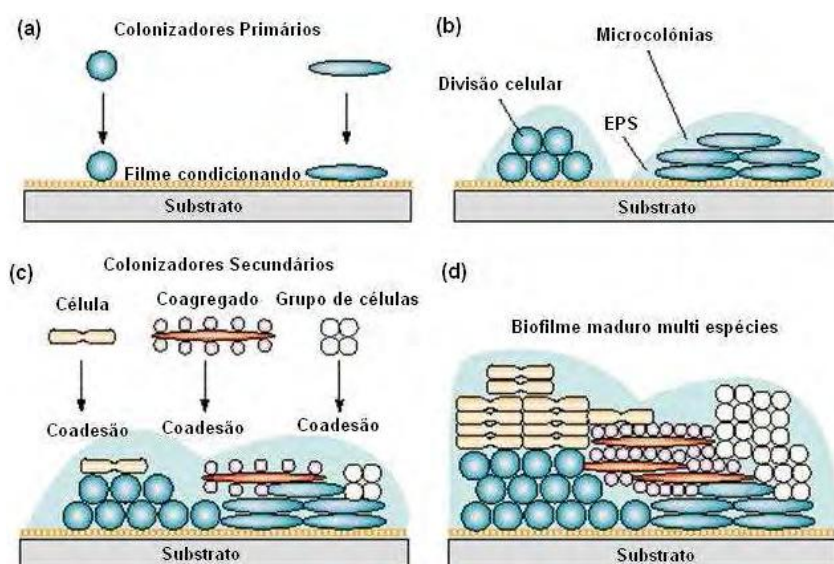


Figura 7 - Desenvolvimento de biofilme. (a) Colonização primária; (b) crescimento, e produção de EPS (exopolímero); (c) coadesão de células individuais, coagregadas e grupos de células, originando biofilme jovem, de múltiplas espécies; (d) maturação e formação de mosaicos clonais no biofilme maduro (CORREIA, 2010).

Gebara (2006) observou que o aumento excessivo na espessura do biofilme pode diminuir a massa específica da biopartícula (biofilme + suporte), o que pode aumentar o risco de carregamento das partículas do biofilme para fora do sistema, e isto por sua vez, prejudica a manutenção da biomassa e a eficiência do reator. Além disso, segundo Covizzi e colaboradores (2007), o acúmulo de biofilme ou exopolissacarídeos sobre a superfície dificulta a absorção de nutrientes resultante das condições não homogêneas do crescimento celular, que por sua vez, dificulta a difusão dos produtos para o meio e a troca gasosa também pode ser comprometida.

Alguns estudos investigaram o papel dos biofilmes no desempenho dos reatores de leito fluidizado, concluindo que o crescimento da biomassa no suporte afeta a hidrodinâmica do leito por modificar o tamanho e densidade aparente da matriz porosa. Ainda, após a partida do

reator, pode haver estratificação do leito, especialmente quando uma velocidade constante de fluidização é aplicada em leito com diferentes tamanhos de partículas (SADER, 2005).

Porém, o desenvolvimento de um biofilme pode proporcionar aos micro-organismos constituintes, benefícios tais como: o aumento da concentração de nutrientes nas interfaces líquido-biofilme, pois a matriz polimérica favorece a adsorção de nutrientes; proteção contra fatores ambientais agressivos (variações de pH, concentrações de sais e metais pesados, desidratação, forças de cisalhamento, substâncias químicas agressivas, bactericidas, antibióticos e predadores); facilidade de desenvolvimento de microconsórcios, que permitem o estabelecimento de relações de simbiose, bem como a utilização de substratos de difícil degradação (CORREIA, 2010).

2.6. SUPORTES UTILIZADOS NA IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE MICRO-ORGANISMOS

A escolha de uma matriz adequada para a imobilização das células é de fundamental importância para a obtenção do produto desejado, por isso a matriz ou o suporte deve ter características desejáveis para imobilizar células microbianas como: ter grande área superficial com espaço intersticial para o crescimento celular; ser facilmente regenerável e passível de reuso; proporcionar a viabilidade celular e atividade catalítica por um longo período de tempo; apresentar porosidade uniforme, a fim de permitir transferências de massa; ter boa estabilidade mecânica, química, térmica e biológica. Ainda, o suporte deve ser composto preferencialmente por um material biodegradável para que não ocasione poluição ambiental após o uso e, finalmente, deve estar disponível em grandes quantidades. Entretanto, não existe um suporte ideal que reúna todas estas características e que possa ser aplicado a qualquer situação (COVIZZI *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 1998).

Segundo Correia (2010), a adesão de micro-organismos ao suporte, a estrutura do biofilme e a velocidade de colonização microbiana dependem de uma série de fatores, tais como: propriedades superficiais do material escolhido (massa específica, rugosidade, porosidade, tamanho dos poros e forma da superfície), micro-organismos envolvidos na adesão, propriedades microbiológicas dos micro-organismos (exopolímeros ou estruturas extracelulares) e propriedades do meio aquoso (presença de substâncias que podem

condicionar as superfícies, pH, temperatura, velocidade de escoamento, tempo de exposição, concentração de micro-organismos, tensão superficial e força iônica do meio). Além disso, deve-se considerar a concentração do substrato e a taxa de transferência de massa na interface biofilme-líquido, fatores que interferem na penetração do substrato no biofilme. De acordo com os mesmos autores, a rugosidade e o diâmetro ideal do suporte são os parâmetros mais importantes, pois aumentam a superfície de contato, mantendo os micro-organismos na superfície da matriz o tempo necessário para ocorrer a adesão irreversível e a formação do biofilme.

Existem muitos materiais com a função de suportes, usados na imobilização de células microbianas para a produção de CGTase, tais como: pedras, carvão, polímeros, alginatos, membranas, entre outros. A Tabela 3 apresenta uma revisão dos trabalhos na área de produção de CGTase que utilizaram a imobilização de micro-organismos do gênero *Bacillus*.

Tabela 3 - Trabalhos publicados na área de produção de CGTase, com *Bacillus* imobilizados e os suportes utilizados.

Micro-organismos	Suportes	Referências
<i>B. brevis</i>	Agar	Stefanova <i>et al.</i> (1998).
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Agar, alginato e poliacrilamida	Abdel-Naby <i>et al.</i> (2000).
<i>B. cereus</i>	Agar, alginato e quitosana	Abdel-Naby <i>et al.</i> (2011).
<i>B. circulans</i>	Agar, alginato e membrana polimérica.	Kocher e Mishra (2009); Vassileva <i>et al.</i> (2003) e (2005); Burhan <i>et al.</i> (2007).
<i>B. pseudocaliphilus</i>	Membrana polimérica e magnetita sinalizada	Atanasova <i>et al.</i> (2009).
<i>B. firmus</i>	SiO ₂ /TiO ₂ ; SiO ₂ /MnO ₂ ; V ₂ O ₅ /SiO ₂ e celulose/TiO ₂ , bucha vegetal.	Moriwaki <i>et al.</i> (2007); Mazzer <i>et al.</i> (2008); Pazzetto <i>et al.</i> (2011).
<i>B. agaradhaerens</i>	PVA-álcool polivinílico	Martins <i>et al.</i> (2003b).
<i>Bacillus</i> sp.	Alginato	Kunamneni <i>et al.</i> (2007).

A Tabela 3 mostra apenas os suportes utilizados na imobilização de micro-organismos do gênero *Bacillus*, em sua maioria agar e alginato, para a produção de CGTase, porém existem outros suportes porosos, que muitas vezes são utilizados com outras finalidades (por

exemplo, imobilização celular no tratamento de efluentes), que também podem ser usados na produção de produtos com valor agregado. É o caso do carvão (vegetal ou animal), por exemplo, muito utilizado na biodegradação de efluentes, mas que pode ser usado como uma alternativa para a imobilização do *Bacillus* produtor de CGTase. A Tabela 4 exibe mais suportes utilizados na imobilização de micro-organismos, para a produção de produtos industrialmente competitivos, como é o caso das enzimas.

Tabela 4 - Trabalhos publicados na área ambiental, com imobilização de micro-organismos e os suportes utilizados.

Micro-organismos	Suportes	Referências
Consórcio	Polímeros	Sader (2005).
Consórcio	Pedra pome	Lapa (2003).
Consórcio	Espuma de poliuretano	Miqueleto (2003).
Consórcio	Carvão Vegetal	Freire <i>et al.</i> (2008).
Consórcio	Carvão Animal	Postma <i>et al.</i> (2010).
<i>Bacillus</i> sp.	Carvão Vegetal	Ullah <i>et al.</i> (2010).
<i>Bacillus</i> sp.	Cerâmica	Xiaoran e Zhongjian (2007).

Na Tabela 4 observa-se que há apenas um trabalho, Postma e coautores (2010), que utiliza o carvão animal na imobilização de células, porém a finalidade do uso continua sendo na área ambiental. Outros autores como Choy e colaboradores (2004); Chen e coautores (2006); Lurtwitayapont e Srisatit (2010) e Guedes e colaboradores (2007) também investigaram o carvão ativado de osso e relataram a excelente capacidade de adsorção no tratamento de efluentes industriais, na remoção de metais pesados, entre outros. Porém, poucos estudos foram encontrados utilizando o carvão animal para a imobilização de micro-organismo, apenas Warren e colaboradores (2009) e Postma e colaboradores (2010), os quais pesquisaram a solubilização do fósforo ou cálcio presentes no carvão de osso, para aplicação como fertilizantes naturais em solo, mas nenhum relato foi encontrado na área de produção enzimática.

Com a finalidade de se utilizar um suporte inovador para imobilização de micro-organismos na área de produção de enzimas, optou-se por investigar as características do carvão ativado de osso bovino. Este carvão apresenta excelente característica adsorvente que tem impulsionado sua utilização em diversas outras áreas, tais como na indústria

minerometalúrgica, para a remoção de metais presentes em efluentes líquidos, em processos em que se deseja purificar, descolorir, recuperar ou remover odores, obtendo-se alta eficiência e baixo custo (GUEDES *et al.*, 2007; BONECHAR, 2011). Adicionalmente, este produto tem despertado grande interesse na imobilização de células, devido à sua alta porosidade, que possibilita que os micro-organismos colonizem e cresçam não somente na superfície do suporte, mas em seu interior, acrescentando carga de biomassa ao processo e aumentando a produção de produtos com maior valor agregado (NGANDWE, 2007; POSTMA *et al.*, 2010).

Historicamente, o carvão de osso foi utilizado para uma série de finalidades por muitos anos. Na agricultura foi utilizado, principalmente, como fertilizante e tem também valor na medicina veterinária, pois é considerado como um antídoto, provavelmente pela habilidade em remover substâncias tóxicas em humanos e animais (NGANDWE, 2007). Além disso, o carvão de osso tem sido usado na indústria de refino do açúcar, para remover pigmentos indesejáveis. Estudos relataram a utilização do carvão de osso no processo de adsorção de radioisótopos e de metais pesados como íons de cobre, mercúrio, manganês, níquel, entre outros (MORENO *et al.*, 2010).

O processo de fabricação do carvão de osso é muito importante quanto às suas características, pois a capacidade de adsorção e a qualidade do carvão são altamente dependentes do tempo e da temperatura de queima. Assim, o procedimento para o preparo do carvão de osso é decisivo para melhorar suas aplicações como, por exemplo, a adsorção de fluoreto na água de consumo humano (RAO *et al.*, 2009; LEYVA-RAMOS *et al.*, 2010). De acordo com o fabricante Bonechar - Carvão Ativado do Brasil, com sede na cidade de Maringá-PR, o carvão de osso bovino (Figura 8) é produzido por pirólise a elevadas temperaturas, 800 °C – 1000 °C em pressão atmosférica, com concentração limitada de oxigênio. Essa limitação possui a finalidade de proporcionar uma alta área superficial ao carvão de osso, que resulta em um produto com forte poder adsorvente. Ainda, devido a esta alta temperatura, o risco de transmissão de doenças é praticamente nulo. Sua principal característica, e que o define, é a grande área superficial interna desenvolvida durante a ativação, formada por milhares de poros, classificados em micro (poros < 2 nm ou 2×10^{-9} m), meso (poros entre 2 nm e 50 nm) e macroporos (poros > 50 nm) (GUEDES *et al.*, 2007; GONÇALVEZ, 2006; GUEDES *et al.*, 2005; POSTMA *et al.*, 2010; BONECHAR, 2011).

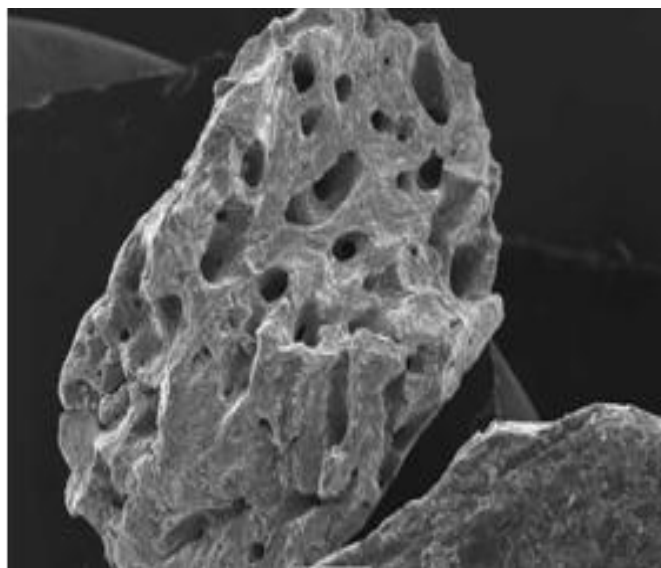


Figura 8 - Microfotografia de carvão de osso bovino granular (GUEDES *et al.*, 2005).

A composição do carvão ativado de osso bovino foi fornecida pelo fabricante Bonechar - Carvão Ativado do Brasil, com sede na cidade de Maringá-PR, em que o carvão ativado de osso tem aproximadamente 10 % de carbono (Tabela 5), diferentemente dos carvões ativados vegetais, que apresentam majoritariamente carbono em sua composição. O carvão ativado de osso apresenta principalmente hidroxapatita (fosfato de cálcio) e em quantidades menores o carbonato de cálcio. A presença de carbonatos concede ao carvão ativado de osso uma capacidade de tamponamento, em que o pH permanece alcalino (GUEDES *et al.*, 2007). Estas propriedades são de grande importância, já que o meio de cultivo do *B. firmus* cepa 37 e de produção de CGTase possuem pH entre 9 e 11.

Tabela 5 - Especificações do carvão ativado de osso bovino.

Propriedades	Especificações
Carbono	9 – 11 %*
Cinza solúvel em ácido	< 3 %*
Fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)	70 – 76 %*
Carbonato de cálcio	7 – 9 %*
Sulfato de cálcio	0,1 – 0,2 %*
Área superficial total (B.E.T. N_2)	200 m^2/g

Área superficial do Carbono	50 m ² /g
Ferro	< 0,3 %*
Tamanho de poros (meso e macroporos)	7,5 – 60000 nm
Volume de poros	0,225 cm ² /g
Umidade	< 5 %*
Densidade Aparente do carvão de osso	0,65 g/cm ³
Dureza	> 80

* porcentagem em massa.

Fonte: Bonechar - Carvão Ativado do Brasil (2011).

A hidroxiapatita ou o fosfato de cálcio cristalino ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), como o componente de maior quantidade no carvão ativado de osso, corresponde aproximadamente a 80 % da massa do carvão de osso (Tabela 5), sendo o componente que caracteriza a origem animal do carvão e de grande importância, pois possui propriedades físicas e químicas que melhoram o mecanismo de remoção de substâncias tóxicas, íons, cátions inorgânicos ou metais pesados, de águas contaminadas. O processo de remoção pode ocorrer por adsorção dessas moléculas ao carvão ou por reações de troca iônica entre os íons em solução e os íons de cálcio de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, removendo cátions inorgânicos (CHOY *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2006; PAN *et al.*, 2009).

Com o objetivo estipulado de estudar a imobilização de *B. firmus* cepa 37, para a produção de CGTase, em um suporte inovador (o carvão ativado de osso bovino) para área de produção enzimática, decidiu-se também investigar a fluidização dessas partículas de carvão ativado de osso em um biorreator de coluna.

2.7. REATOR DE LEITO FLUIDIZADO

Com a finalidade de melhorar a produção enzimática, vários são os processos e modelos de operações desenvolvidos, tais como: fermentação submersa ou no estado sólido e operações em batelada, batelada alimentada, contínua, com reciclo, entre outras (IBRAHIM *et al.*, 2010). Existem diferentes tipos de reatores que são usados na produção de enzimas, a partir de células imobilizadas, como exemplos: os reatores de leito fixo, em que o suporte

permanece estático durante todo o processo e os reatores em que o suporte se movimenta pelo escoamento de fluido no reator ou pelo borbulhamento de gases (CORREIA, 2010).

Os reatores em que o suporte está em constante movimento são reatores em coluna e apresentam o escoamento ascendente, possibilitando a sua fluidização. Nestes reatores ocorre a imobilização dos micro-organismos em um suporte fluidizado, que possibilita ao suporte a retenção de grande concentração de biomassa, melhorando o contato biomassa-substrato e permitindo a operação em tempos de residência menores, do que em outros tipos de leitos. A característica principal do reator de leito fluidizado é que a velocidade do líquido é maior que a velocidade de sedimentação das partículas do suporte, que permanecem em suspensão, ou seja, a vazão de meio injetada, em fase líquida, deve ser suficiente para manter as biopartículas em suspensão e promover boa mistura entre ambos (CORREIA, 2010).

Os processos de transferência de gases que ocorrem no reator de leito fluidizado estão ilustrados na Figura 9. Em geral, nos processos aeróbios a velocidade de transferência de oxigênio para as células microbianas é um fator limitante, que pode determinar a velocidade de conversão biológica, por isso, a disponibilidade de oxigênio para os micro-organismos depende da sua solubilidade no meio, da transferência de massa, bem como da velocidade de consumo do oxigênio dissolvido (REIS, 2007).

A concentração de saturação de oxigênio em água a uma temperatura de 37 °C e 1 atm com adição de ar atmosférico é 6,71 mgO₂.L⁻¹. Apesar de ser possível conhecer o volume teórico de oxigênio disponível, a sua concentração não é conhecida, pois a solubilidade do oxigênio é influenciada pela composição do meio de cultura, pressão do sistema, temperatura e agitação (MARQUARDT, 2003).

Os processos considerados por Nicolella e colaboradores (1999) para caracterizar o consumo de oxigênio nestes sistemas são: fluxo de gás convectivo no reator; transferência da fase gasosa à fase líquida pela interface líquido-gás, não assumindo nenhuma resistência de transferência de massa no interior da fase gasosa; transferência da fase líquida à fase sólida pela interface líquido-sólido, com resistência de transferência de massa no lado líquido e reação e difusão na fase de biofilme (Figura 9).

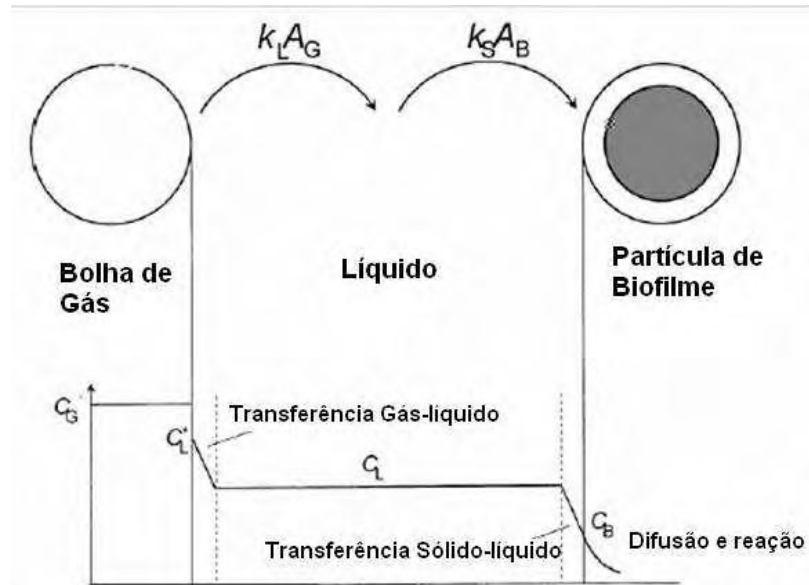


Figura 9 - Transferência gasosa em reatores trifásicos. Adaptado de Nicolella *et al.* (1999).

A Figura 9 mostra que em reatores aeróbios o oxigênio é consumido à medida que penetra no biofilme, e que segundo Correia (2010), quando o teor de oxigênio atinge valores que determinam condições anaeróbias, pode ocorrer o desenvolvimento de duas camadas no biofilme, dependendo da sua espessura e da quantidade de oxigênio dissolvido. A aplicação de escoamento turbulento garante maior interação entre as partículas, e devido ao atrito e às tensões de cisalhamento líquido-superfície têm-se controle da espessura e melhora nas condições de transporte de nutrientes às regiões mais profundas por processos difusivos. Por outro lado, a influência negativa da hidrodinâmica é a possibilidade de desprendimento de grandes quantidades de biomassa ativa, dependendo das condições de escoamento, implicando no seu carregamento para fora do reator devido à alta velocidade de circulação (CORREIA, 2010).

A formação do biofilme também está ligada à velocidade de escoamento sobre a superfície e dentre as vantagens do leito fluidizado está o crescimento da biomassa em filmes de espessura reduzida, que melhora as transferências de massa. Além disso, a fluidização reduz ou elimina os problemas de entupimento, aumenta a retenção de biomassa e o contato desta com o substrato e em consequência, permite reduzir o tempo de residência nos reatores. Estas características fazem do reator aeróbio de leito fluidizado uma boa opção para a produção de enzima com células imobilizadas. Outros fatores que contribuem para a

eficiência do processo de leito fluidizado são: contato maior entre o meio líquido e o sólido do suporte do biofilme, quando comparado com leito fixo (devido ao movimento da partícula e velocidade do líquido, a resistência difusional do líquido é mínima); problemas de canais preferenciais e aglomeração de partículas, frequentemente encontrados em leito fixo, são evitados; capacidade de controlar e otimizar a espessura do biofilme; necessidade de uma menor área transversal de escoamento (CABELLO *et al.*, 2009; FREIRE *et al.*, 2008; SADER, 2005).

Outro biorreator com possíveis resultados positivos na produção de CGTase é o reator airlift. Este reator difere da coluna de bolhas e do reator de leito fluidizado pela presença de um tubo de sucção. As principais funções deste tubo são: aumentar o processo de mistura no reator e reduzir a coalescência das bolhas. As pequenas bolhas no reator aumentam a área de superfície para a transferência de oxigênio. Além disso, o tubo de sucção equaliza as forças de cisalhamento ao longo do reator. Isto pode ter sido o motivo pelo qual se conseguiu produção, das células cultivadas nos reatores do tipo airlift, maior quando comparada com a produção enzimática de células cultivadas em reatores do tipo tanque agitado. (AHAMED e VERMETTE, 2010; KUNAMNENI *et al.*, 2007).

Codas e colaboradores (2002) realizaram um estudo para investigar a transferência de oxigênio em um reator do tipo aerado submerso com e sem enchimento e utilizaram para isso um difusor de bolhas finas (tipo disco de membrana perfurada de EDPM) e outro de bolhas grossas (tubo de PVC com furos de 2,1 mm e 3,1 mm de diâmetro), em que os testes foram feitos em água limpa. Os autores concluíram que em um reator aerado sem enchimento, o difusor de bolhas finas é muito superior em termos de transferência de oxigênio do que um difusor de bolhas grossas. Porém, quando o enchimento é colocado no reator, o difusor de bolhas grossas melhora significativamente a transferência de O₂, enquanto que o enchimento pouco interferiu na transferência de oxigênio com o difusor de bolhas finas mantendo a eficiência de transferência do gás.

Contudo, para um maior entendimento do reator de leito fluidizado, é recomendável o estudo da expansão do leito como também sua porosidade e as velocidades envolvidas na fluidização, que serão vistas na Seção 3.1.4.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, descrevem-se os procedimentos experimentais desenvolvidos para a realização deste trabalho, bem como detalhes do reator, materiais e equipamentos utilizados. Apresenta-se também, a metodologia adotada para as análises das amostras e caracterização do material suporte. A Figura 10 apresenta uma visão geral do relacionamento entre os temas que serão apresentados neste Capítulo.

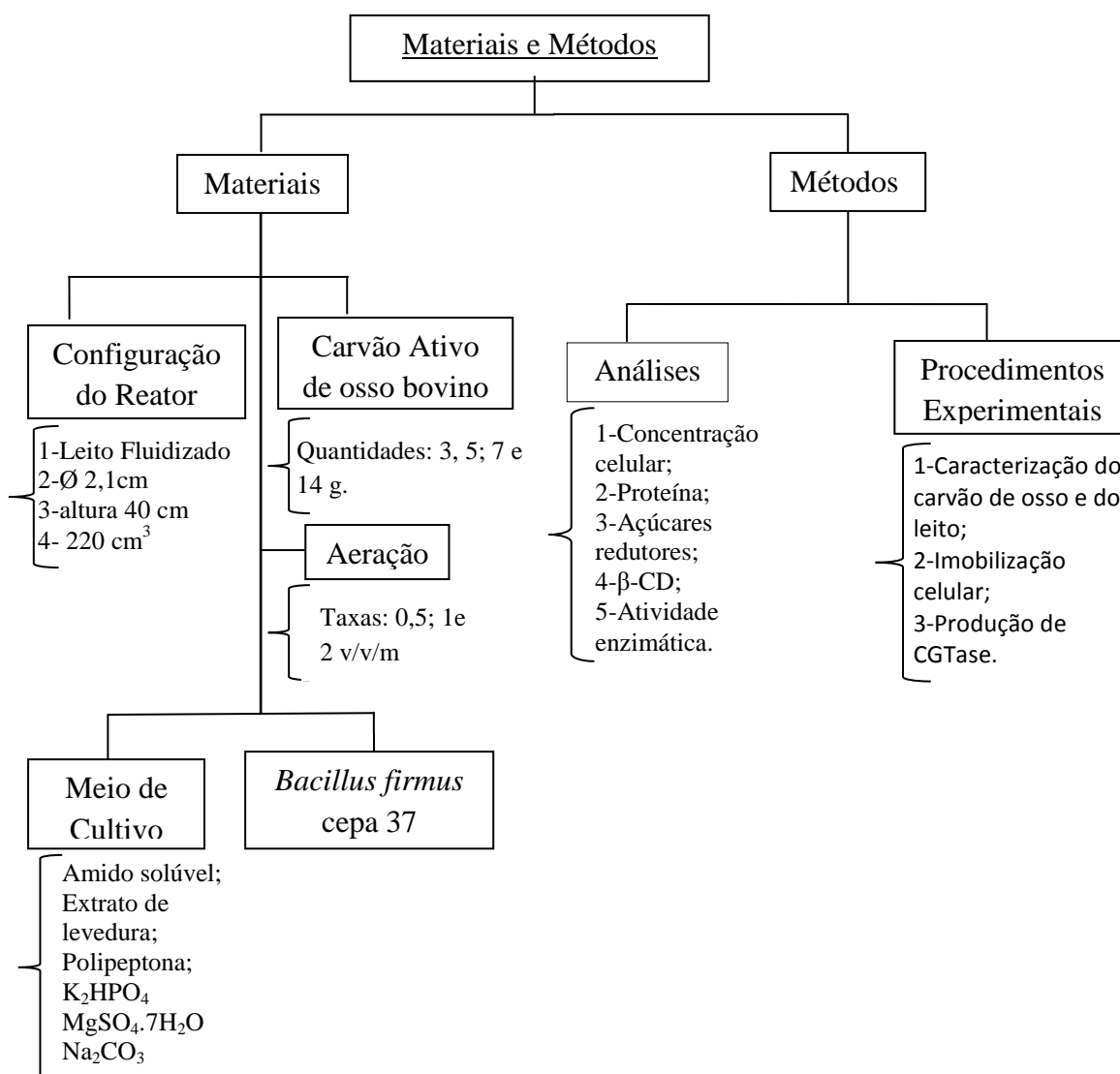


Figura 10 - Organograma do projeto de pesquisa.

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Micro-organismo, Meio e Condições de Cultivo

O micro-organismo utilizado foi o *B. firmus* cepa 37, isolado de solo de plantação de mandioca e caracterizado por Matioli (1997 e 1998). O micro-organismo é aeróbio estrito, com o tamanho estimado em 0,5 μm x 5,0 μm (MORIWAKI *et al.*, 2007) e tem crescimento ótimo na temperatura de 37 °C e pH acima de 9, características estas que foram consideradas e utilizadas neste trabalho. *B. firmus* cepa 37 encontra-se armazenado em temperatura ambiente, acondicionado em solo, que foi previamente esterilizado e em seguida inoculado com o micro-organismo, que permanece em estado de dormência na forma de esporos.

Para a reativação da cepa, esta foi primeiramente cultivada em meio solidificado, com composição (m/v): amido solúvel (QUEMIS) 1,0 %; peptona bacteriológica (HIMEDIA) 0,5 %; extrato de levedura (HIMEDIA) 0,5 %; fosfato de potássio dibásico (REAGEN) 0,1 %; sulfato de magnésio hepta-hidratado (SYNTH) 0,02 %; carbonato de sódio (SYNTH) 1,0 %; ágar (BD DIFCO) 1,5 % e vermelho de congo (BIOTEC) 0,01 % (NAKAMURA e HORIKOSHI, 1976; MATIOLI, 1997). Neste meio o micro-organismo foi mantido a 37 °C, por 48 h e após este período, este foi transferido para o meio líquido em erlenmeyers (pré-inoculo), com a mesma composição do meio solidificado exceto ágar e vermelho do congo e com 2,0 % (m/v) de amido solúvel. O volume de líquido total utilizado foi de 300 mL para o ensaio com as células livres do *B. firmus* cepa 37 (descrito na Seção 4.4.1) e de 1500 mL para os ensaios com as células imobilizadas no carvão de osso.

3.1.2. Imobilização de *Bacillus firmus* cepa 37 no carvão de osso

Após a reativação da cepa o pré-inoculo foi mantido a aproximadamente 130 rpm e 37 °C por 24 h em agitador orbital. Este meio líquido com o *B. firmus* cepa 37 após as 24 h de agitação foi diluído em 50 % (v/v), com novo meio líquido na ausência do micro-organismo, para que a $\text{DO}_{660\text{ nm}}$ (densidade óptica) do meio permanecesse entre 0,4 e 0,6. Em seguida, o meio líquido de produção foi adicionado à coluna, que já continha o carvão de osso estéril nas quantidades de estudo, isto é, 3,5; 7 e 14 g. A etapa de imobilização do micro-organismo no carvão que teve duração de 24 h foi realizada em sistema batelada, em leito fluidizado, utilizando-se diferentes taxas de aeração: 0,5; 1 e 2 v/v/m (volume de ar/ volume de

meio/minuto). O fornecimento de ar foi realizado no frasco (erlenmeyer) em que o meio reacional se encontrava e a taxa de aeração foi calculada, com o auxílio de um rotâmetro, em que era bombeado para o frasco o volume de ar igual ao volume do meio de produção em um intervalo de tempo de 1 min. Depois da etapa de imobilização o meio que serviu para a imobilização celular foi todo retirado e adicionou-se à coluna novo meio de produção enzimática, na ausência de micro-organismos em suspensão, pois as células do *B. firmus* cepa 37 já estavam imobilizadas no carvão de osso, dando início às produções enzimáticas (Seções 4.3.2 e 4.3.3).

3.1.3. Caracterização do carvão ativado de osso bovino

Amostras de carvão ativado de osso bovino foram fornecidas pela empresa Bonechar do Brasil – Carvão Ativado, localizada na cidade de Maringá-PR. O carvão de osso, primeiramente foi peneirado na granulometria de 20 a 28 Mesh (0,83 e 0,58 mm, respectivamente) e posteriormente lavado repetidas vezes com água deionizada, para eliminação da fuligem, e em seguida seco em estufa por 24 h a 100 °C. A caracterização do carvão ativado de osso bovino envolveu a obtenção de isotermas de adsorção por N₂ para estimar a área específica do carvão, pelo modelo de B.E.T. (Brunauer-Emmett-Teller). As determinações do volume e do diâmetro de poros; a análise de difração de raios X para verificar a estrutura cristalina do carvão; a determinação do diâmetro médio das partículas de carvão, densidade cristalina, porosidade interna do carvão de osso e a densidade do carvão seco.

3.1.3.1. Difração de Raios X do Carvão de Osso

A difração de raios-X (DRX) representa o fenômeno de interação entre o feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material. A técnica consiste na incidência da radiação em uma amostra e na detecção dos fótons difratados, que constituem o feixe difratado. Em um material em que os átomos estejam arranjados periodicamente no espaço, característica das estruturas cristalinas, o fenômeno da difração de raios-X ocorre nas direções de espalhamento que satisfazem a Lei de Bragg. Admitindo que um feixe

monocromático de determinado comprimento de onda (λ) incide sobre um cristal a um dado ângulo, chamado de ângulo de Bragg, tem-se: $n \lambda = 2 d \sin \theta$; em que: θ corresponde ao ângulo medido entre o feixe incidente e determinados planos do cristal, “d” é a distância entre os planos de átomos e “n” a ordem de difração (CULLITY, 1956). A principal aplicação da difração de raios X refere-se à identificação de compostos cristalinos, sejam eles inorgânicos ou orgânicos. Portanto a difração de raios X ou DRX foi realizada com o objetivo de comprovar a origem animal do carvão, ou seja, a confirmação da existência de hidroxiapatita.

3.1.3.2. Diâmetro Médio de Carvão de Osso (d_p)

A determinação do diâmetro médio de carvão de osso bovino foi feita por meio da análise granulométrica, utilizando-se um conjunto de peneiras do sistema TYLER, que apresentavam aberturas listadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Abertura das malhas das peneiras utilizadas na análise do diâmetro médio de carvão de osso.

MESH	Abertura da peneira (mm)
16	1,190
20	0,841
28	0,653
32	0,537

O procedimento consistiu em peneirar, até massa constante, uma quantidade conhecida de carvão de osso bovino. Pela diferença das massas das peneiras vazias e as mesmas contendo carvão, encontrou-se as frações retidas em cada peneira. O processo de peneiramento e pesagem foi repetido até se obter massa aproximadamente constante em cada peneira. Desta forma, o diâmetro médio de Sauter foi então calculado pela Equação 3.1:

$$d_p = 1 / \sum_{i=1}^n (x_i / d_{pi}) \quad (3.1)$$

Em que:

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

x_i = fração mássica das partículas de carvão de osso retidas em cada peneira.

3.1.3.3. Densidade cristalina do Carvão de Osso

Para determinar a densidade cristalina do carvão ativado de osso bovino foi necessário utilizar balão volumétrico de 100 mL, devidamente aferido com água destilada, à temperatura ambiente (ZANIN, 1989). O procedimento consistiu em transferir uma quantidade conhecida de carvão (m_p) para o balão volumétrico, deixando-o sob vácuo a fim de eliminar o ar contido nos poros das partículas e o ar existente entre as partículas. Em seguida, foi adicionada lentamente água destilada, ainda sob vácuo, até o completo umedecimento do carvão. Então, foi completado o volume total do balão. O volume da matriz porosa (V_c) foi determinado por diferença entre o volume total do balão aferido (V_b) e o volume total de água utilizada (V_a). Assim, a densidade (ρ_c) foi calculada pela Equação 3.2.

$$\rho_c = m_p / V_c \quad (3.2)$$

3.1.3.4. Densidade aparente do carvão de osso

A densidade aparente do carvão de osso (ρ_{ap}) corresponde a densidade úmida do carvão e foi determinada utilizando a densidade cristalina do carvão (ρ_c), porosidade do carvão (ε_p) e a densidade do meio de produção (ρ_{meio}). A densidade aparente do carvão de osso (g/cm^3) foi calculada pela Equação 3.3.

$$\rho_{ap} = \{[(1 - \varepsilon_p) (\rho_c)] + [\varepsilon_p (\rho_{meio})]\} \quad (3.3)$$

3.1.3.5. Porosidade Interna do Carvão de Osso

A metodologia de determinação da porosidade interna da partícula consistiu em adicionar água lentamente sob vácuo e vigorosa agitação do frasco contendo o carvão. Considera-se o final da titulação quando se observa forte adesão das partículas de carvão nas paredes do recipiente, mas sem excessos de água. O volume de vazios no carvão de osso (V_{zp}) correspondeu ao volume de água gasto na titulação (V_a), que é obtido a partir da massa de água utilizada (m_a), ou seja, $V_{zp} = V_a = m_a/\rho_a$, em que ρ_a é a densidade da água na temperatura ambiente. O volume total das partículas de carvão de osso (V_p) correspondeu à soma do volume de vazios (V_{zp}) e do volume da matriz porosa (V_c) ($V_p = V_{zp} + V_c$). A porosidade interna do carvão de osso foi calculada pela relação entre o volume de vazios (V_{zp}) e o volume total das partículas de carvão de osso (V_p) (Equação 3.4).

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

3.1.3.6. Densidade do Carvão de Osso Seco

A densidade do carvão de osso seco (ρ_p) corresponde à massa específica da matriz na condição dos poros estarem ocupados por ar, e é determinada pela relação entre a porosidade interna do carvão de osso (ε_p) e a densidade cristalina da matriz porosa (ρ_c) (Equação 3.5).

$$\rho_p = (1 - \varepsilon_p)\rho_c = \frac{m_p}{V_{zp} + V_c} = \frac{m_p}{V_p} \quad (3.5)$$

3.1.3.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As células imobilizadas no carvão de osso foram colocadas em uma solução de 2,5 % de glutaraldeído por 24 h. Após este período, o sobrenadante foi descartado e as células imobilizadas foram lavadas com solução etílica com as respectivas porcentagens: 30, 50, 70,

90 e 100 % (v/v), permanecendo durante 10 a 15 min em cada solução. O material foi mantido em álcool absoluto para desidratação e subsequente extração com fluido supercrítico utilizando CO₂ sob alta pressão. Para obter as micrografias, um microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu, modelo SS 550) com uma voltagem de aceleração de 10 kV foi utilizado. As amostras foram colocadas sobre a superfície de uma fita condutora dupla face e revestido de ouro (MORIWAKI *et al.*, 2007a).

3.1.4. Estudo do Leito Fluidizado

O desempenho de um reator de leito fluidizado é influenciado por diversas variáveis que podem ser controladas pelo projetista. Essas variáveis incluem a altura do leito expandido, a altura inicial do leito ou a quantidade de material sólido utilizado para suporte de crescimento, a espessura do biofilme e a área transversal do fluxo do reator. Para um dado meio suporte, a espessura de equilíbrio do biofilme depende da vazão de escoamento ascendente, da altura expandida do leito e do volume do meio suporte (GEBARA, 2006).

Para um dado conjunto de condições de operação, uma análise da expansão do leito fluidizado proporciona informação sobre a relação entre a porosidade do leito fluidizado (ε) e a velocidade superficial do meio de produção (u), bem como a obtenção da velocidade terminal das partículas de carvão de osso (u_t), o coeficiente de expansão (n) e a velocidade mínima de fluidização (u_{mf}), pelo ajuste da correlação empírica de Richardson e Zaki (1954) aos dados experimentais.

A análise experimental da relação velocidade-porosidade envolve a medida da altura do leito fluidizado, e em seguida o cálculo da porosidade (ε) pela Equação 3.6.

$$\varepsilon = (V_t - V_c)/V_t = 1 - m_p/(\rho_p A_R H) \quad (3.6)$$

Em que:

A_R = área da seção reta do reator (cm²)

H = altura do leito de partículas de carvão de osso (cm)

m_p = massa de carvão de osso (g)

V_c = volume da matriz porosa (cm³)

V_t = volume total do reator ($V_t = A_R \cdot H$) em cm³

ε = porosidade do leito

ρ_p = densidade do carvão de osso seco (g/cm³)

Resultados experimentais demonstraram que a relação velocidade-porosidade para o leito fluidizado sólido-líquido depende mais da massa total de partículas sólidas quando a razão diâmetro da coluna (d_i) / diâmetro da partícula (d_p) é maior que 10-20. Em um gráfico logarítmico esta relação é aproximadamente linear (TARDIOLI, 1998; TARDIOLI *et al.*, 2000).

A correlação de Richardson e Zaki (1954), entre a porosidade e a velocidade superficial de fluidização é apresentada na Equação 3.7 e a Equação 3.8 correlaciona o efeito de parede sobre a expansão do leito.

$$(u/u_{tc}) = \varepsilon^n \quad (3.7)$$

$$\text{Log}u_{tc} = \text{log}u_t - d_p/d_i \quad (3.8)$$

Em que:

d_i = diâmetro interno do reator (cm)

d_p = diâmetro do carvão de osso (cm)

n = coeficiente de expansão

u = velocidade superficial do meio de produção (cm/s)

u_t = velocidade terminal do carvão de osso (cm/s)

u_{tc} = velocidade terminal corrigida do carvão de osso (cm/s)

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

$$n = 4,65 + 20d_p/d_i \quad \text{Re}_p < 0,2 \quad (3.9)$$

$$n = (4,4 + 18d_p/d_i) \text{Re}_p^{-0,03} \quad 0,2 < \text{Re}_p < 1,0 \quad (3.10)$$

$$n = (4,45 + 18d_p/d_i) \text{Re}_p^{-0,1} \quad 1,0 < \text{Re}_p < 200 \quad (3.11)$$

$$u_t = g(\rho_{ap} - \rho_{meio})d_p^2/(18\mu_{meio}) \quad \text{Re}_p < 0,4 \quad (3.12)$$

$$u_t = [4g^2(\rho_{ap} - \rho_{meio})^2/(225\rho_{meio}\mu_{meio})]^{1/3}d_p \quad 0,4 < \text{Re}_p < 500 \quad (3.13)$$

Em que:

g = aceleração gravitacional (cm/s^2)

Re_p = número de Reynolds da partícula ($\text{Re}_p = \rho \cdot d_p \cdot u_t / \mu$)

μ_{meio} = viscosidade do meio de produção (g/cm s), determinada pelo estudo reológico a 37°C .

ρ_{meio} = densidade do meio de produção (g/cm^3)

ρ_{ap} = densidade aparente do carvão de osso (g/cm^3), determinada pela Equação 3.3.

ρ_c = densidade cristalina do carvão de osso (g/cm^3)

ε_p = porosidade interna do carvão de osso, determinada pela Equação 3.4.

Sabe-se que o tamanho e a distribuição de tamanhos dos sólidos, bem como a relação entre as densidades do fluido e do sólido, são os principais fatores que influenciam a forma de ocorrência da fluidização. Geralmente, sistemas sólido-líquidos fluidizam mais homoganeamente, enquanto sistemas sólidos-gases apresentam maior grau de heterogeneidade (CORREIA, 2010).

O início da fluidização pode ser determinado pela velocidade mínima de fluidização (u_{mf}), que depende da forma, do tamanho e da densidade da partícula (ZANIN, 1989). Esta velocidade mínima pode ser calculada, para $\text{Re}_p > 20$, pela Equação simplificada 3.14 (KUNII e LEVENSPIEL, 1969).

$$u_{mf} = (\Psi d_p)^2 (\rho_{ap} - \rho_{meio})g\varepsilon_{mf}^3/[150\mu_{meio}(1 - \varepsilon_{mf})] \quad (3.14)$$

Em que:

ε_{mf} = porosidade do leito na condição de mínima fluidização

ψ = esfericidade ($\psi = 1$ para esferas ou $\Psi = 0,75$, para o carvão de osso, de acordo com Oka (2004), este valor de esfericidade se aproxima da forma de um cilindro, que é a forma geométrica da maioria das partículas de carvão observada na microscopia eletrônica de varredura).

A expansão do leito contendo carvão de osso bovino foi conduzida no biorreator de leito fluidizado, utilizando-se como fluido o meio de cultura do micro-organismo, que é o mesmo meio de produção da enzima (descrito na Seção 3.1.1), porém o meio não continha meio orgânico nem a CGTase. O meio de produção enzimática sem células de *B. firmus* cepa 37 foi caracterizado com os seguintes parâmetros: densidade do meio de $1,148 \text{ g/cm}^3$, viscosidade do meio de 1,2548 centipoise (cP) ou $1,2548 \times 10^{-2} \text{ g/(cm.s)}$ na temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e densidade úmida do carvão de osso ou densidade aparente de $1,8006 \text{ g/cm}^3$.

O procedimento para a caracterização do leito fluidizado consistiu, primeiramente em adicionar ao biorreator 10 g de carvão de osso, limpo, seco e estéril. Após a completa compactação das partículas de carvão de osso, expandiu-se o leito de forma rápida até a altura máxima permissível sem que se observasse o arraste de partículas (aproximadamente 16,3 cm, sendo que a altura total da coluna era igual a 40 cm). A partir deste ponto, tinha início o processo da diminuição gradativa da vazão, até que o leito de partículas de carvão retornasse à condição de leito fixo. Operava-se por 10 min em cada vazão para garantir a completa estabilização do leito e media-se então a vazão do meio de produção e a altura do leito, em duplicata.

A porosidade do leito (ε) foi calculada usando-se a massa de 10 g de carvão de osso no reator ($m_p = 10 \text{ g}$) e área da seção reta do reator (A_R) de $3,461 \text{ cm}^2$ ($A_R = \pi R^2$). Os dados experimentais de porosidade do leito em função da velocidade superficial do meio de produção forneceram a velocidade mínima de fluidização (u_{mf}) correspondendo à interseção dos ajustes da correlação de Richardson e Zaki (1954), para as regiões de leito fixo e leito fluidizado.

3.1.4.1. Reator de Leito Fluidizado

O reator de leito fluidizado constituía-se de uma coluna de vidro cilíndrica central na qual permanecia o leito de partículas de carvão de osso com as células do *B. firmus* cepa 37 imobilizadas e de um tubo cilíndrico coaxial externo, formando uma camisa, no qual se fazia a circulação de água aquecida a aproximadamente 37 °C em banho termostatizado, para a manutenção da isothermicidade do sistema. A coluna central apresentava diâmetro interno igual a 2,1 cm e altura de 40 cm, com volume total de 140 cm³. A vazão de entrada e de saída do reator de leito fluidizado foi mantida com o auxílio de uma bomba peristáltica e a vazão de entrada foi calculada a partir da velocidade mínima de fluidização, obtida de dados experimentais da porosidade do leito em função da velocidade superficial do meio de produção (Seção 4.2). Uma seringa foi utilizada para retirar amostras do meio. O efluente do reator foi coletado em um erlenmeyer que servia de reservatório para a recirculação do fluido no reator. Utilizou-se também um agitador magnético, a fim de que as condições do meio no erlenmeyer fossem homogêneas. Foi necessário um sensor de temperatura do meio para monitoramento e manter o líquido recirculante a 37°C.

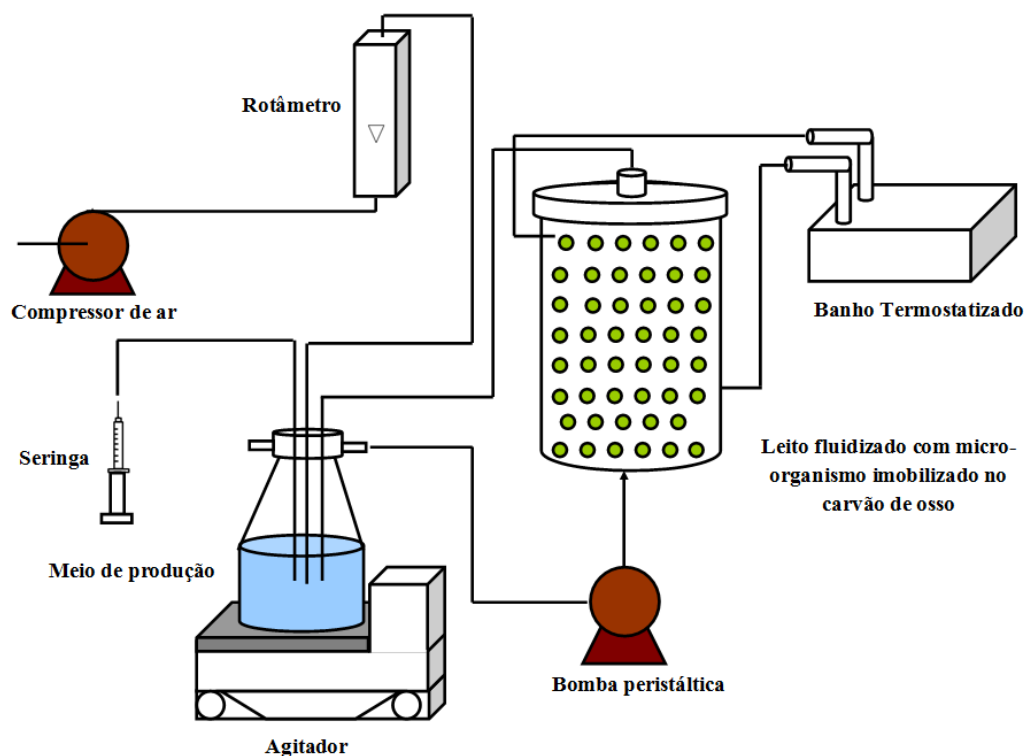


Figura 11 - Organograma do projeto de pesquisa.

3.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.2.1. Determinação da concentração de β -CDs

Foi medida apenas a concentração de β -CD, pois foi concluído por Matioli (1997), que o *B. firmus* cepa 37 é produtor da enzima β -CGTase, uma vez que a concentração de β -CD é maior do que a de γ -CD em qualquer tempo de produção, e a produção de α -CD é insignificante, quando comparada com as outras duas CDs.

A determinação da concentração de β -CD utilizando o método de dosagem colorimétrica ou espectrofotometria pela fenolftaleína (FENF) baseia-se na formação de um complexo entre o corante e a molécula de CD a dosar, que causa redução da intensidade de cor da solução. A descoloração da solução, devido à complexação das moléculas de α , β e γ -CD com a fenolftaleína é muito mais marcante para a β -CD, sendo, portanto este método preferencialmente utilizado para a determinação desta CD.

Como o complexo FENF-CD possui uma absorvância diferente da FENF livre, isso permite quantificar a CD presente na amostra. No entanto, a relação entre a absorvância e a concentração de β -CD, somente permanece linear para concentrações até 0,4 mM. Acima deste limite, faz-se necessário o uso da teoria da complexação (Anexo 9), que fornece a relação não linear entre a absorvância e a concentração de β -CD, como descrito por Hamon e Moraes (1990).

A metodologia consistiu em inicialmente obter uma curva de calibração para a dosagem de β -CD (Apêndice 8.1.1.), em que: uma solução estoque de FENF (3 mM) foi preparada em etanol 95 %; também foi preparada uma solução estoque de tampão carbonato-bicarbonato com concentração de 0,6 M e pH 10,5; misturou-se 2 mL de solução estoque de fenolftaleína 3 mM com 20 mL de tampão carbonato-bicarbonato 0,6 M, completou-se o volume para 100 mL com água destilada e obteve-se uma solução de fenolftaleína 0,06 mM, utilizada nas dosagens de β -CD. Soluções de tampão Tris-HCl (0,05 M e pH 8,0) e CaCl_2 (5 mM) foram feitas e usadas na curva de calibração da CD como também na diluição das amostras, quando necessário. Uma solução de Tris-HCl foi preparada dissolvendo-se o Tris (hidroximetil) amino-metano em água destilada e adicionando-se lentamente, sob constante agitação, HCl concentrado até pH 8,0. A solução estoque de β -CD (1 mM), para a curva de calibração foi preparada com 0,1135 g, com correção da umidade de β -CD (ACROS ORGANICS) e

dissolvendo-se em 20 mL de tampão Tris-HCl (0,05 M e pH 8,0), mais 10 mL de solução de CaCl_2 (5 mM) e completando-se o volume para 100 mL com água destilada.

As dosagens foram realizadas misturando-se 0,5 mL de cada amostra contendo β -CD, com 2,5 mL de uma solução de fenolftaleína 0,06 mM, contendo tampão carbonato-bicarbonato 0,6 M, pH 10,5 e lendo-se a absorvância em 550 nm em espectrofotômetro UV-VIS UV-1203 (SHIMADZU). A concentração de β -CD foi determinada pela Equação 3.16, sendo ABS a absorvância da amostra a 550 nm, ABS_o a absorvância de FENF em água e como auto-zero (água destilada) a 550 nm, a concentração de β -CD ($C_{\beta\text{-CD}}$) expressa em mM, e k a constante de equilíbrio da formação do complexo β -CD/FENF. O valor da constante de equilíbrio do complexo β -CD/FENF foi determinado pela regressão não linear da Equação 3.15, para uma série de dados de absorvância em função da concentração padrão de β -CD ($(0-1) \times 10^{-3}$ M) preparada em água destilada e tampão Tris-HCl (0,05 M e pH 8,0) e CaCl_2 (5 mM).

$$C_{\beta\text{-CD}} = a \left[1 - \frac{ABS}{ABS_o} \right] \left[1 + \frac{ABS_o}{a(k)ABS} \right] \quad (3.15)$$

$$C_{\beta\text{-CD}} = 0,3 \left[1 - \frac{ABS}{ABS_o} \right] \left[1 + 1,07215 \frac{ABS_o}{ABS} \right] \quad (3.16)$$

Em que a é a concentração total de fenolftaleína na cubeta de dosagem (5×10^{-5} M).

Primeiramente, as concentrações padrões de β -CD foram determinadas a partir da curva de calibração da absorvância em função da concentração de β -CD. A constante de equilíbrio (k) foi calculada utilizando o método Quasi-Newton, resultando em $18655,7 \text{ M}^{-1}$. A Equação 3.16 foi obtida pela substituição de k e do valor de a na Equação 3.15 e multiplicando essa equação por um fator igual a 6000 (fenolftaleína), que está relacionado com a diluição do procedimento, e que converte M em mM, sendo a unidade da concentração de β -CD.

3.2.2. Determinação da Atividade de CGTase

A velocidade da maioria das reações enzimáticas diminui com o tempo, devido a fatores como: alterações do pH do meio, da temperatura reacional, inibição da enzima pelos produtos; decréscimo da concentração do substrato à medida que a reação avança e reações reversas podem se tornar mais importantes, devido ao aumento da concentração de produtos. Esses fatores, agindo isoladamente ou em conjunto, contribuem para que a curva de reação enzimática não siga exatamente as equações das reações químicas homogêneas (DIXON e WEBB, 1979).

A atividade de CGTase é determinada a partir da medida da velocidade inicial (Método das velocidades iniciais) de acordo com Hamon e Moraes (1990) e a análise de atividade de CGTase foi realizada nas seguintes condições: temperatura de 50 °C (para ativação da enzima), pH 8,0 (maior estabilidade da enzima), baixas concentrações de substrato e de enzima (para que a concentração de β -CD produzida em função do tempo, siga uma relação linear).

A solução estoque de substrato foi feita utilizando 1 % (m/v) de dextrina (FLUKA), dissolvendo-a em 50 mL de solução estoque de CaCl_2 (5 mM) e 100 mL de tampão Tris-HCl (0,05 M e pH 8,0), completando-se o volume para 500 mL. As amostras enzimáticas, quando necessário, foram diluídas com tampão Tris-HCl e solução estoque de CaCl_2 , em proporções que garantissem a região linear de reação. Os tubos de dosagem contendo 1,0 mL de substrato foram colocados no banho a 50 °C durante 15 min. Nestes tubos, foram adicionados 1,0 mL do meio enzimático, obedecendo ao tempo de reação de cada amostra, ou seja, desde o primeiro tubo até o sétimo o tempo de reação variou de 0 até 30 min. Decorrido este tempo, os tubos foram colocados em um banho a 100 °C por 5 min para a inativação da enzima e, em seguida, resfriados em água à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas dosagens colorimétricas da β -CD adicionando 2,5 mL de fenolftaleína (FENF) em 0,5 mL coletado de cada tubo das velocidades iniciais.

Os dados de produção de β -CD ($\mu\text{moles CD produzida}/(\text{mL de cultura} \cdot \text{min})$) foram inseridos em um gráfico em função do tempo de reação, obtendo-se o coeficiente angular da reta ajustada (K), que foi utilizado para calcular a atividade de CGTase, com a Equação 3.17:

$$A = (K \cdot V_R \cdot D) / V_E \quad (3.17)$$

Em que:

A = atividade de CGTase em $\mu\text{moles CD} / (\text{min} \times \text{mL de solução enzimática})$, K = inclinação da reta de concentração de CDs produzidas em função do tempo de reação ($(\mu\text{moles CD} / (\text{min} \times \text{mL}))$), D = diluição real do meio enzimático, V_R = volume total de reação em mL, presente no tubo de ensaio, V_E = volume de enzima em mL, para o teste descrito.

Uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima, que catalisa a transformação de um μmol de substrato ou a formação de um μmol de produto por minuto, nas condições de reação (pH 8 e 50 °C).

3.2.3. Determinação da Concentração de Proteínas Solúveis

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (1951) que consiste em usar o reagente de fenol (reagente de Folin-Ciocalteu), sendo que a coloração final resulta: (i) da reação da proteína com o íon cobre em meio alcalino, e (ii) da redução do reagente fosfomolibdico-fosfotungstênio pela tirosina e triptofano presentes na proteína. O método apresenta sensibilidade para uma faixa de 10 – 200 μg (microgramas) de proteína presente na amostra. Para a determinação da curva de calibração proteica (Apêndice 8.1.2.) foi utilizada albumina de soro bovino (SIGMA) em solução estoque contendo 4 g de proteína total em 100 mL de água e diluída de modo a se ter uma solução contendo 1 mg proteína/mL de solução (diluição 1,25:50). Posteriormente, foram preparados tubos de ensaio, contendo diferentes concentrações de proteína. De cada tubo, foi coletado 0,1 mL da amostra diluída e adicionado 0,4 mL de água, em seguida foi acrescentado 5 mL do reagente de cobre. O reagente de cobre foi preparado no dia de uso com uma solução de 4 % (m/v) de tartarato de sódio e potássio e 2 % (m/v) de solução de cobre. Completou-se o volume com uma solução de carbonato de sódio (2 % (m/v)) e mais hidróxido de sódio 0,1 M. Esperou-se exatos 10 min e adicionou-se 0,5 mL do reagente de fenol diluído, em seguida todos os tubos foram agitados no vortex e aguardou-se mais exatos 10 min para leitura em espectrofotômetro a 625 nm.

3.2.4. Curva Padrão para a Determinação de Açúcares Redutores

Um açúcar é dito redutor se ele possui na molécula um grupo aldeído ou cetona ou ainda, os açúcares que não possuem estes grupos, mas são capazes de formar estas cadeias orgânicas quando em solução por isomerismo e com isso podem sofrer reações de oxidação. Exemplos de açúcares redutores são: a glicose, a maltose, o amido, entre outros. (LEHNINGER *et al.*, 1995). A concentração de açúcares redutores (AR) foi determinada pelo aumento da absorvância a 600 nm de uma solução contendo meio enzimático e o reagente DNS. Este método baseia-se na redução do ácido 3,5-dinitro-salicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico (MILLER, 1959). Para a determinação da curva de calibração (Apêndice 8.1.3.) foram utilizados os açúcares frutose (VETEC) e glicose (CARLOS ERBA-ANALYTICALS) em solução. Este método é conhecido como método DNS - BERKELEY modificado, em que em um tubo de ensaio contendo 2,5 mL de reagente DNS foram adicionados 0,5 mL de amostra. A mistura foi levada a um banho em 100 °C durante 10 min, em seguida resfriada. Posteriormente, adicionou-se 3 mL de água destilada, agitou-se em vórtice e a leitura foi efetuada em espectrofotômetro a 600 nm, utilizando-se 0,5 mL de água destilada e 2,5 mL de reagente DNS como branco, que também foi adicionado no banho em ebulição.

3.2.4.1. Determinação da Concentração de Açúcares Redutores Totais das Amostras

A determinação da concentração de açúcares redutores totais foi feita a cada 12 h, coletando-se uma quantidade de amostra e após centrifugação, 10 mL do meio enzimático foram transferidos para um balão de fundo chato, contendo uma solução de 2 mL de ácido clorídrico concentrado (38 %) em cerca de 130 mL de água destilada. O balão foi aquecido durante 2 h e 30 min com posterior resfriamento, ocorrendo o processo de hidrólise ácida do amido e das CDs presentes. Em seguida, foram adicionadas algumas gotas de solução de fenolftaleína (3 mM) para a titulação com uma solução de NaOH 2 M. O volume da solução foi completado para 200 mL em balão volumétrico e medida a concentração de açúcares redutores totais (ART) pelo método DNS, descrito na Seção 3.2.4.

3.2.5. Determinação da Concentração Celular

A metodologia seguida, para a determinação da concentração celular de *B. firmus* cepa 37, foi de Alves e colaboradores (2002) e Marques (2004), em que o meio de produção enzimática contendo as células livres do micro-organismo foi centrifugado e posteriormente as células do precipitado foram ressuspensas, em um mesmo volume de água destilada igual ao da amostra inicial e então efetuada a leitura em espectrofotômetro a 660 nm, utilizando-se água destilada como auto-zero. O procedimento realizado para a curva de calibração de concentração celular do *B. firmus* cepa 37 foi feito com um meio de cultivo, que permaneceu quatro dias em agitador orbital e, depois, todo o volume de 500 mL foi centrifugado (9000 rpm, 15 min, 4 °C), em seguida o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensado no mesmo volume inicial de 500 mL. Com as células microbianas ressuspensas foram feitas diluições e filtrou-se em membrana de éster de celulose (0,45 µm) e em seguida foram colocadas em vidro relógio previamente pesados e mantidos em estufa a 80 °C, até peso constante. Sabendo a massa da membrana antes e depois da filtração e o volume de cada diluição realizada que foi igual a 20 mL, pode-se calcular a curva de calibração da concentração celular do micro-organismo em g/L (Apêndice 8.1.4.).

3.3. PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

Para compreender melhor as interações entre as quantidades de carvão de osso e as aerações sobre a produção de CGTase foi escolhido o ponto de 120 h ou o final da produção para as análises do planejamento de experimento 3^2 . O planejamento envolveu duas variáveis: carvão de osso em três níveis: 3,5; 7 e 14 g e taxas de aeração em três níveis: 0,5; 1 e 2 v/v/m, composto pelo ponto central com 7 g de carvão e as aerações de 0,5; 1 e 2 v/v/m. Os resultados foram analisados com 90 % de confiança com o auxílio da ferramenta operacional Statistica 7.1. Com o pacote de software desenvolveu-se o desenho experimental, a análise de dados e a construção do modelo quadrático. Uma superfície de resposta para o modelo proposto também foi gerada para compreender a interação das variáveis de resposta.

No modelo estatístico o “z” é a variável resposta e é denotada pela atividade de CGTase em U/mL, “x” e “y” são as variáveis independentes, ou seja, a quantidade de carvão de osso (g) e a taxa de aeração (v/v/m), respectivamente. O modelo quadrático para analisar os efeitos

das duas variáveis independentes sobre a atividade de CGTase foi expressa de acordo com a Equação 3.18.

$$z = \beta_0 + \alpha x + \beta y + \alpha_1 x^2 + \beta_1 y^2 + \Delta xy + \varepsilon \quad (3.18)$$

Além das variáveis já definidas, z , x e y , tem-se que β_0 é o coeficiente de interseção, α e β são os coeficientes dos termos lineares, α_1 e β_1 são os coeficientes dos termos quadráticos e Δxy , que é a interação entre as variáveis x e y . A análise estatística do modelo quadrático com interação foi realizada pela análise de variância (ANOVA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos, de acordo com a metodologia apresentada no Capítulo 3, serão mostrados e discutidos neste capítulo e os experimentos realizados durante todo o trabalho sempre tiveram como objetivo produzir CGTase em biorreator, a partir de *B. firmus* cepa 37, analisando a atividade de CGTase, concentração de β -CD, de proteínas solúveis e de açúcares redutores ao longo do tempo de produção.

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO CARVÃO ATIVADO DE OSSO BOVINO

A amostra de carvão de osso bovino foi triturada e peneirada para que ao final do processo fosse possível obter uma granulometria de 100 mesh, ou seja, 0,149 mm. O carvão de osso foi então encaminhado para o COMCAP (Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa, UEM, Maringá/PR), para análise de difração de raios X (DRX). Os resultados obtidos nesse teste encontram-se na Figura 12.

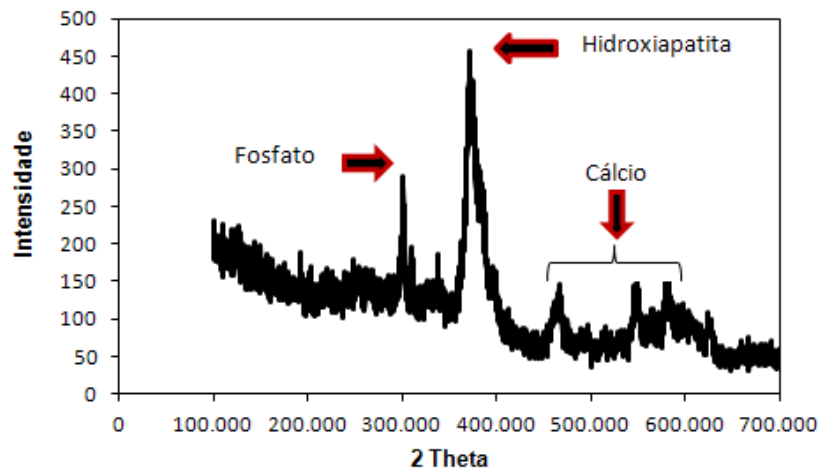


Figura 12 - Difração de Raios X do carvão de osso bovino.

Verificou-se na Figura 12, a identificação pontual de elementos químicos na superfície do carvão de osso, evidenciando a presença de elevados teores de fósforo e cálcio e a difração

de raios-X indicou também a presença de hidróxido de fosfato de cálcio ou hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), que é o principal mineral que constitui os ossos. Os resultados de DRX estão de acordo com os relatados na literatura sobre caracterização de carvão animal (LURTWITAYAPONT e SRISATIT, 2010; PAN *et al.*, 2009; HASSAN *et al.*, 2008; GUEDES *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2006; CHOY E McKAY, 2005). Todos esses resultados evidenciaram a presença de hidroxiapatita nos carvões, por meio da análise de DRX, com picos desse mineral localizados muito próximos dos indicados na Figura 12.

Na Tabela 7 são apresentados todos os resultados obtidos de caracterização do carvão de osso, ou seja: diâmetro médio das partículas de carvão de osso (d_p), densidade cristalina (ρ_c), porosidade interna do carvão, densidade seca do carvão de osso (ρ_p), área superficial das partículas de carvão, volume e diâmetro dos poros. Resultados importantes para a fluidização do meio, pois sabe-se que o tamanho e a distribuição de tamanhos dos sólidos, bem como a relação entre as densidades do fluido e do sólido, são os principais fatores que influenciam a forma de ocorrência da fluidização. Geralmente, sistemas sólido-líquido fluidizam mais homoganeamente, enquanto sistemas sólido-gás apresentam maior grau de heterogeneidade (CORREIA, 2010).

Tabela 7 - Caracterização do carvão ativado de osso bovino.

Análises	Valores
Diâmetro médio das partículas de carvão de osso (d_p), mm	0,80
Densidade cristalina (ρ_c), g/cm^3	$2,85 \pm 0,25$
Porosidade interna do carvão de osso (ε_p)	$0,61 \pm 0,004$
Densidade do carvão de osso seco (ρ_p), g/cm^3	$1,10 \pm 0,01$
Área superficial, m^2/g	123,5
Volume total dos poros, cm^3/g	0,277
Diâmetro médio dos poros, Å	89,85

A caracterização do carvão de osso bovino foi realizada com a granulometria de carvão homogênea, esta foi uma possibilidade apontada para que os valores da Tabela 7 ficassem

discrepantes dos apresentados pelo fabricante (Tabela 5). No entanto, os valores de densidade cristalina, área superficial, volume e diâmetro dos poros (Tabela 7) estão em concordância com os reportados por Wilson, Pulford e Thomas (2003); Guedes e colaboradores (2007) e Lurtwitayapont e Srisatit (2010), porém a porosidade interna do carvão de osso é maior que o valor apresentado pelos últimos autores, que trabalharam com o carvão de osso de origem suína. A explicação pode estar no fato do carvão de osso bovino, do fabricante Bonechar - Carvão Ativado do Brasil, ser ativado no processo de fabricação, o que pode ter aumentado a porosidade interna do carvão. Além disso, as metodologias utilizadas neste trabalho podem ter sido diferentes das empregadas por esses autores e pelo fabricante Bonechar.

4.2. ESTUDO HIDRODINÂMICO DO REATOR DE LEITO FLUIDIZADO

Os resultados experimentais da altura do leito em função da velocidade superficial do meio de produção, obtidos no reator de leito fluidizado, conforme metodologia apresentada na Seção 3.1.4, são apresentados na Tabela 8. Utilizando-se as alturas do leito fluidizado medidas a partir das vazões de entrada na coluna, calculou-se a porosidade do leito expandido (Equação 3.6) e a velocidade superficial do meio de produção (Equação 3.7).

Tabela 8 - Velocidade superficial do meio de produção (u) em função da porosidade do leito fluidizado (ϵ).

Vazão média (mL/min)	H (cm)	ϵ	u (cm/s)
0	4,5	0,4123	0,0000
1,8	4,5	0,4123	0,0087
12,8	4,5	0,4123	0,0616
28	4,5	0,4123	0,1348
29	4,5	0,4123	0,1396
91	4,6	0,4250	0,4381
140	4,8	0,4490	0,6740
190	5,3	0,5010	0,9147
198	5,5	0,5191	0,9532
218	5,7	0,5360	1,0495
222	5,7	0,5360	1,0688
273	6,2	0,5734	1,3143

A partir da porosidade do leito em função da velocidade superficial do fluido ajustou-se as correlações de Richardson e Zaki e de Kunii e Levenspiel (Equações 3.7, 3.8, 3.11, 3.13 e 3.14) aos dados experimentais, cujos cálculos encontram-se no Apêndice 8.2. Resultados experimentais de Tardioli (1998) e Tardioli e colaboradores (2000) demonstraram que a relação velocidade-porosidade para o leito fluidizado sólido-líquido depende mais da massa total de partículas sólidas quando a razão diâmetro da coluna (d_i) / diâmetro da partícula (d_p) é maior que 10-20. Em um gráfico logarítmico esta relação é aproximadamente linear. A curva característica da relação entre a porosidade do leito e a velocidade superficial do meio de produção, obtida para o carvão de osso no meio reacional sem o micro-organismo, é apresentada na Figura 13. Nota-se claramente a presença das duas regiões que são muito importantes para o estabelecimento de critérios de projeto, pois o ponto de intersecção das retas de ajuste dos dados define a mudança do regime de escoamento, ou seja, de leito fixo para leito fluidizado.

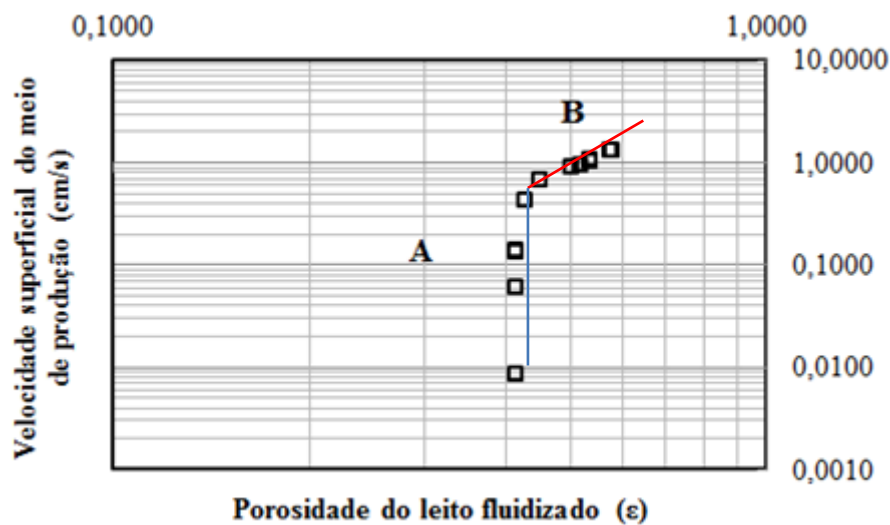


Figura 13 - Dados de velocidade superficial do fluido (meio de produção) usado para a fluidização das partículas de carvão ativado de osso e sua correspondente porosidade do leito fluidizado, aos quais foi ajustada a correlação de Richardson e Zaki (1954). Leito expandido (A) e Leito fluidizado (B).

Na Figura 13, a região A corresponde à região de leito expandido, enquanto a região B corresponde à região de leito fluidizado e a velocidade mínima de fluidização (u_{mf}) foi determinada pela intersecção das retas, que se ajustam aos pontos das regiões A e B. Porém,

primeiramente foram calculados os valores de n (coeficiente de expansão), u_t (velocidade terminal do carvão de osso), u_{tc} (velocidade terminal corrigida do carvão de osso) e u_{mf} (velocidade mínima de fluidização) para os dados experimentais e em seguida o cálculo dos mesmos parâmetros para valores teóricos e também o cálculo de Re_p (Reynolds do carvão de osso que foi igual a 6,39), em que se utilizou a u_t dos dados experimentais. O procedimento dos cálculos para os valores experimentais e teóricos encontra-se no Apêndice 8.2.1. e os dados utilizados do carvão de osso e do meio de produção para os cálculos foram:

$$d_i \text{ da coluna} = 2,1 \text{ cm}$$

$$d_p = 0,8 \text{ mm} = 0,08 \text{ cm}$$

$$\rho_{\text{meio}} \text{ (densidade do meio de produção a } 37 \text{ }^\circ\text{C)} = 1,148 \text{ g/cm}^3$$

$$\varepsilon_p \text{ (porosidade do carvão de osso)} = 0,6172$$

$$\mu_{\text{meio}} \text{ (viscosidade do meio de produção a } 37 \text{ }^\circ\text{C)} = 1,2548 \times 10^{-2} \text{ g/(cm.s)} = 1,2548 \text{ cP}$$

$$g \text{ (aceleração da gravidade)} = 980 \text{ cm/s}^2$$

$$\rho_c \text{ (densidade cristalina do carvão de osso)} = 2,8536 \text{ g/cm}^3$$

$$\rho_{\text{ap}} \text{ (densidade aparente do carvão de osso)} = \{[(1 - \varepsilon_p) (\rho_c)] + [\varepsilon_p (\rho_{\text{meio}})]\} = \{[(1 - 0,6172) (2,8536)] + [0,6172 (1,148)]\} = 1,8006 \text{ g/cm}^3$$

Os cálculos forneceram os resultados de todos os parâmetros necessários para o estudo de leito fluidizado e na Tabela 9 apresenta-se a comparação dos valores teóricos e experimentais obtidos.

Tabela 9 - Comparação entre os valores experimentais e teóricos dos parâmetros u_t , u_{tc} , u_{mf} e n .

Parâmetros	Valor experimental	Valor teórico
u_t (cm/s)	0,88	6,4
u_{tc} (cm/s)	0,12	5,84
n	5,97	4,25
u_{mf} (cm/s)	0,47	0,16

u_t = velocidade terminal do carvão

u_{tc} = velocidade terminal corrigida do carvão

u_{mf} = velocidade mínima de fluidização

n = coeficiente de expansão do leito fluidizado

Observa-se na Tabela 9, que os valores previstos por meio das correlações empíricas de Richardson e Zaki (1954), para todos os parâmetros utilizados no estudo do leito fluidizado se distanciam dos valores experimentais. Uma explicação já apresentada para este tipo de comportamento foi proposta por Riba e Couderc (1977), que ajustaram duas retas diferentes para os dados de baixa e alta porosidade, na região A da Figura 13, encontrando diferentes valores para a velocidade terminal e para a velocidade terminal corrigida do carvão de osso, já que esta velocidade depende da inclinação da reta ajustada e assim, obtendo outros valores para os demais parâmetros envolvidos.

Apesar das diferenças entre os valores teóricos e experimentais, trabalhou-se com o valor de velocidade mínima de fluidização obtido com os dados experimentais de porosidade do leito fluidizado e de velocidade superficial do meio de produção e concluiu-se que quando o fluido atingir 0,47 cm/s, a fluidização do leito será iniciada. Ainda com o estudo do leito fluidizado foi possível obter o tempo de residência ou de permanência de um volume (± 140 mL) de meio reacional dentro do reator e que foi de aproximadamente 0,5 min (Apêndice 8.2.2.). Para escoar pelo biorreator todo o volume reacional disponível (1500 mL), utilizando a velocidade mínima de fluidização, seria necessário o tempo de aproximadamente 6 min.

4.3. ESTUDO DE ADSORÇÃO DE CGTASE NO CARVÃO ATIVADO DE OSSO BOVINO

Entende-se por adsorção como sendo um processo de separação, na qual certos componentes de uma fase fluida são transferidos para a superfície de um sólido adsorvente (McCABE, SMITH e HARRIOT, 2001). Antes de iniciar os ensaios de produção de CGTase com o carvão ativado de osso bovino foi realizado um estudo de adsorção para identificar a capacidade do carvão ativado de osso de adsorver CGTase, ou seja, para verificar se toda a enzima determinada encontrava-se no meio de produção, ou se havia enzima imobilizada no carvão de osso. Para isso, foi utilizada a enzima CGTase produzida em agitador orbital com células livres do *B. firmus* cepa 37, sem sua concentração nem purificação, e a atividade da enzima foi medida primeiramente no tempo zero, e inicialmente a cada 15 min, até completar 2 h. Como não houve diferença entre as atividades enzimáticas em relação ao tempo zero, optou-se por analisar a atividade de CGTase, aproximadamente, a cada 6 ou 12 h. A Figura

14, apresenta o ensaio de adsorção no carvão de osso, em que a atividade de CGTase e a atividade específica de CGTase, medidas no meio líquido, estão em função do tempo.

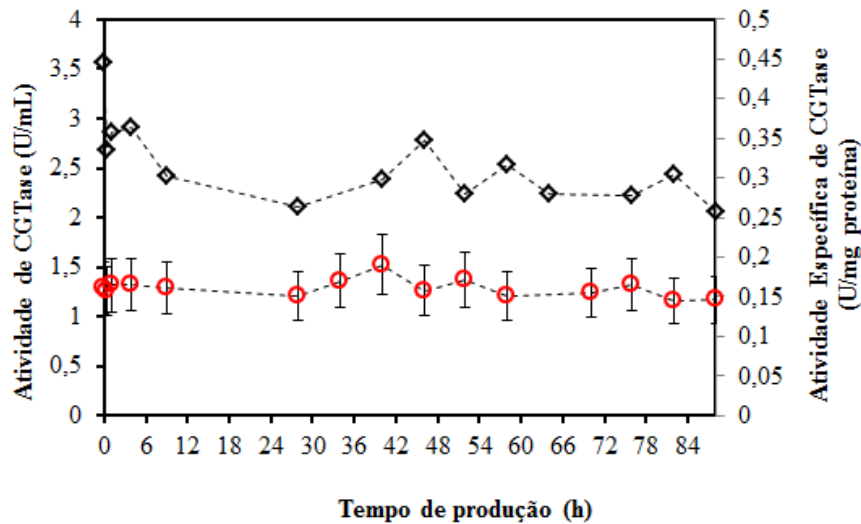


Figura 14 - Adsorção enzimática no carvão ativo de osso: Atividade de CGTase (círculo) e atividade específica de CGTase (losango) em função do tempo de produção da enzima.

De acordo com a Figura 14, há pequenas alterações da atividade de CGTase e da atividade específica de CGTase em 88 h analisadas, porém essas oscilações nos valores das atividades enzimáticas referem-se ao método espectrofotométrico utilizado na análise e estão de acordo com o desvio padrão de 10 a 20 % do ensaio realizado em duplicata. Portanto, não houve, ou não foi significativa, a adsorção de CGTase no carvão ativado de osso. Além disso, o processo de imobilização/adsorção enzimático é muito utilizado quando o principal interesse é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade, que não sejam afetados durante o processo (CANTARELLI, 1989). No entanto, nesta pesquisa o objetivo não foi imobilizar a CGTase, mas sim, certificar-se que a atividade enzimática determinada estivesse no meio líquido e não parcialmente adsorvida no carvão. Como não houve nenhum tratamento prévio do carvão de osso, por exemplo, utilizando ácidos, a imobilização/adsorção da enzima CGTase no carvão de osso não foi favorecida. A partir deste resultado foi possível afirmar que se o micro-organismo produziu CGTase, a enzima estava no meio líquido de produção e não adsorvida no carvão de osso.

Para iniciar a produção de CGTase foram realizados ensaios com o micro-organismo livre ou sem uso do carvão de osso no meio reacional, que serão mostrados na Seção 4.4.1 e então produções enzimáticas com o bacilo imobilizado no carvão de osso.

4.4. PRODUÇÃO DE CGTASE COM *B. firmus* CEPA 37

Nesta Seção serão discutidos os resultados da produção da CGTase de *B. firmus* cepa 37, com células livres e imobilizadas em carvão de osso.

4.4.1. Produção de CGTase com Células Livres de *B. firmus* cepa 37

Primeiramente, foi realizada a produção de CGTase com células livres de *B. firmus* cepa 37, isto é, sem o uso do carvão de osso, em que o meio líquido (300 mL) foi mantido em agitador orbital a 140 rpm e 37 °C, sem suplementação de ar. Esta produção enzimática com as células livres foi estudada para conhecer as fases de crescimento celular e a duração de cada uma, para posterior imobilização microbiana na fase de crescimento do bacilo correta, no carvão de osso. Além disso, a produção de CGTase nessas condições específicas foi realizada para comparar as atividades de CGTase deste ensaio com os resultados que foram obtidos posteriormente com as células imobilizadas no carvão de osso e com suplementação de ar. Na Figura 15 são mostrados os resultados obtidos nesta produção enzimática, em termos de atividade de CGTase (U/mL) em 96 h, e também foi acompanhado, no mesmo frasco agitado, o crescimento do micro-organismo, em termos de concentração celular (g/L). Os ensaios foram realizados em duplicata, com desvio padrão de 10-20 % para ambas as medidas.

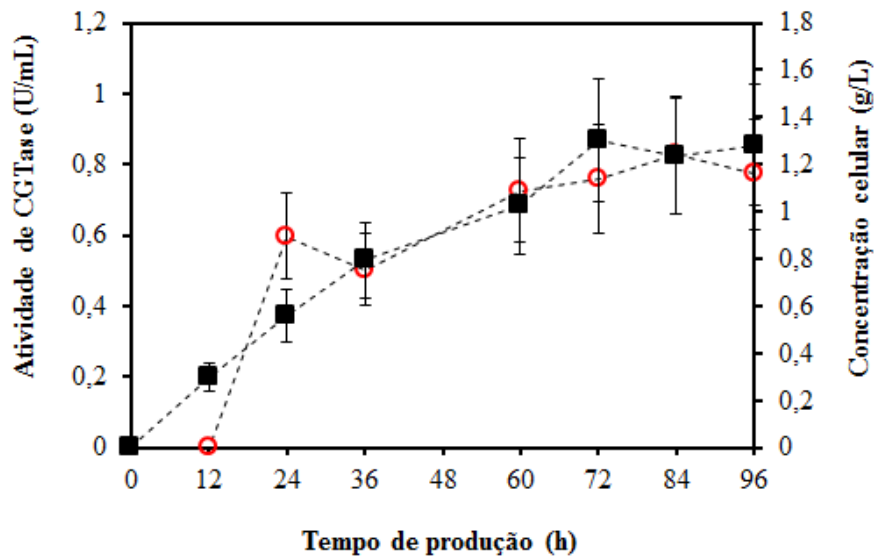


Figura 15 - Atividade de CGTase (círculo) e concentração celular (quadrado) em função do tempo de produção enzimática, com células livres no meio do *B. firmus* em agitador orbital.

Observa-se na Figura 15, que a atividade de CGTase e a concentração celular do micro-organismo aumentam até 96 h, alcançando valor máximo de 0,77 U/mL e de 1,28 g/L, respectivamente. O valor da atividade de CGTase está acima do reportado por autores, tais como, Atanasova e coautores (2011), que obtiveram atividade de aproximadamente 0,06 U/mL e que utilizaram o *Bacillus* sp., para a produção de CGTase em batelada, sem suplementação de ar. Bonilha e colaboradores (2006) investigaram a produção de CGTase em batelada, a partir de *Bacillus licheniformis* e obtiveram atividade de CGTase igual a 0,162 U/mL em 12 h de produção, com meio produtivo contendo amido de batata. Já os autores Alves e colaboradores (2002) reportaram valor próximo de atividade de CGTase igual a 0,55 U/mL em 120 h de produção, para *B. firmus* cepa 37, porém o amido utilizado no meio reacional estava hidrolisado e também utilizaram quantidades superiores (4 vezes maior) de extrato de levedura e peptona.

Verificou-se também na Figura 15 que a atividade de CGTase e a concentração celular de *B. firmus* cepa 37 possuem perfis de crescimento semelhantes, então as mesmas condições do meio de cultivo que favoreceram a reprodução e o crescimento do micro-organismo, neste caso, foram também favoráveis à produção enzimática. O mesmo foi relatado por Gawande e colaboradores (1998) e Pinto e coautores (2011), em que nos cultivos em batelada a produção enzimática estaria parcialmente associada ao crescimento microbiano, com máxima atividade

ao final da fase exponencial. Vassileva e coautores (2005) trabalharam com diferentes condições de aeração e encontraram um perfil de crescimento celular semelhante para o *Bacillus circulans*. Em contra partida, outros autores, tais como: Rosso e colaboradores (2002) e Moriwaki e colaboradores (2009) documentaram que algumas vezes as melhores condições para o crescimento microbiano não são as mesmas para a produção de enzima, pois elevadas concentrações de biomassa, contribuem para um meio reacional mais viscoso, resultando em diminuição do oxigênio dissolvido e assim menores quantidades de enzima. Neste trabalho, foi possível concluir que a associação do crescimento celular e de produção de CGTase é um ponto positivo, pois quanto maior a concentração celular no meio, mais células estarão produzindo a enzima e a concentração celular obtida (Figura 15) não prejudicou a transferência de oxigênio, que foi facilitada pela boa agitação do meio.

Foi possível ainda na Figura 15 identificar algumas das fases do crescimento celular, ou seja: a fase log ou de crescimento exponencial, que teve duração do início da produção até 72 h, fase esta em que as células iniciam a divisão celular e a reprodução celular encontra-se extremamente ativa e com maior atividade metabólica. Outra fase é a estacionária entre 72 h e 96 h, neste período o crescimento celular diminui e a população microbiana é estável, pois o número de morte celular é equivalente ao número de células novas, ocorrendo também o acúmulo de metabólitos, como as enzimas (BORZANI, 2001). Não foi possível a identificação das fases lag (fase de adaptação microbiana) e de morte celular ou declínio, pois a fase lag pode ter ocorrido nas primeiras horas, ou seja, antes de 12 h, em que a concentração celular não foi medida e a fase de morte celular ocorreu depois de 96 h. Foi importante a identificação das fases de crescimento celular, pois os resultados obtidos serão considerados na imobilização do micro-organismo no carvão de osso, isto é, a imobilização celular deverá ser feita no período em que *B. firmus* cepa 37 está em sua melhor fase reprodutiva, ou seja, a fase log ou de crescimento microbiano (entre 12 e 72 h), pois há mais células viáveis no meio de produção.

4.4.2. Produção de CGTase em Bateladas Repetidas com Células Imobilizadas do *B. firmus* cepa 37 em Carvão de Osso Bovino

A segunda etapa de produção enzimática envolveu os ensaios em bateladas repetidas de 48 h cada e a imobilização do micro-organismo no carvão de osso ocorreu como descrito na

Seção 3.1.2, com exceção de que não houve a diluição do meio utilizado para a imobilização celular e o volume usado em cada batelada foi igual a 600 mL; e ainda utilizou-se a suplementação de ar de 1 v/v/m, no frasco contendo o meio reacional e 7 g de carvão de osso bovino na coluna do biorreator. O procedimento para a produção de CGTase em bateladas repetidas ocorreu depois da imobilização celular no carvão de osso e iniciou-se quando foi adicionado ao biorreator o primeiro meio de produção com ausência de células. O primeiro meio de produção enzimática permaneceu de 0 a 48 h, depois todo este meio foi retirado e o frasco contendo o meio usado foi reservado para posteriores análises. Em seguida foi adicionado ao biorreator novo meio de produção (sem células) para o início da segunda batelada de 60 a 96 h, depois deste tempo foi retirado e reservado o meio utilizado e adicionado um novo meio (sem células) dando início à terceira batelada de produção de CGTase de 108 a 144 h, assim sucessivamente com a quarta (156 a 192 h) e a quinta bateladas (204 a 240 h) e todas bateladas aconteceram em leito fluidizado.

A imobilização de células microbianas em carvão ativado de osso para a produção de enzima, ainda não foi reportada na literatura, pois na maioria dos casos este carvão é utilizado em pesquisas ambientais, como o tratamento de águas contaminadas por metais pesados ou corantes, para a decomposição de compostos orgânicos poluentes, entre outros (COSTA *et al.*, 2007; GUEDES *et al.*, 2007). A Figura 16 mostra os resultados obtidos, a cada batelada, da atividade de CGTase e a atividade específica de CGTase durante o tempo de produção enzimática analisada.

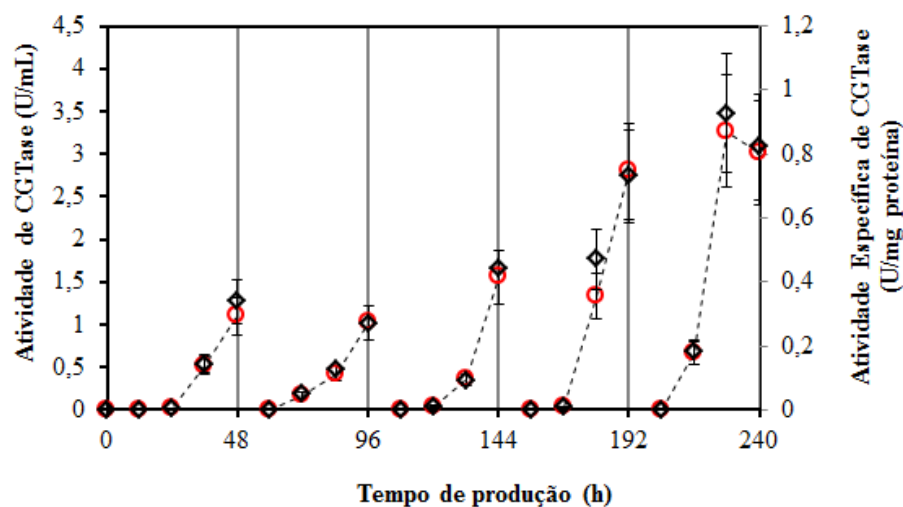


Figura 16 - Atividade de CGTase (círculo) e atividade específica de CGTase (losango) em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado no carvão de osso, em cinco bateladas repetidas de 48 h, sendo que de 0 a 48 h perfaz a 1ª batelada, de 60 a 96 h a 2ª batelada, e assim sucessivamente.

Como exposto na Figura 16, os valores finais da atividade específica de CGTase (U/mg proteína) e da atividade de CGTase aumentam a cada batelada. Exemplificando com os resultados da atividade de CGTase, ao final da 1ª batelada em 48 h o valor foi igual a 1,10 U/mL, ao final da 2ª batelada em 96 h permaneceu igual, mas nas 3ª (144 h), 4ª (192 h) e 5ª (240 h) bateladas a atividade de CGTase aumenta progressivamente, com os valores iguais a 1,56; 2,8 e 3,0 U/mL, respectivamente. O aumento da atividade enzimática ao longo das bateladas pode estar associado a maior quantidade de biofilme no carvão de osso. Letsididi *et al.* (2011) estudaram o *Bacillus licheniformis* tolerante a pHs elevados na produção de CGTase em batelada com células livres e sem suplementação de ar, de uma β -CGTase, e verificaram que a máxima atividade enzimática alcançada foi igual a 0,14 U/mL em 48 h. Quando comparou-se com os resultados obtidos neste trabalho (Figura 16), as atividades de CGTase alcançadas foram maiores para qualquer batelada,. Verificando-se a importância da suplementação de ar no meio, como também a importância da imobilização do micro-organismo no carvão e a fluidização do leito.

Autores como: Abdel-Naby e colaboradores (2000); Abdel-Naby e colaboradores (2011); Vassileva e colaboradores (2003) e Atanasova e colaboradores (2009) também trabalharam com bateladas repetidas e com o micro-organismo imobilizado para a produção de CGTase e uma justificativa apresentada por esses autores foi a necessidade de melhorar as condições de produção, antes de iniciar uma produção enzimática contínua ou com um tempo mais elevado de produção. Entender e identificar quais são os parâmetros de produção da enzima como: agitação, aeração, vazão mínima, pH, entre outros, que podem afetar positiva ou negativamente, e buscar os limites destes parâmetros, que devem ser respeitados para uma melhor produção de CGTase. Esses autores utilizaram um tempo menor de produção enzimática igual a 48 h, porém suficiente para a produção da enzima e em repetidas vezes para aumentar a produção de CGTase e para verificar como a atividade enzimática comporta-se com os parâmetros do meio produtivo. Neste trabalho o objetivo de produzir CGTase em bateladas repetidas também foi usado com a finalidade de investigar a eficiência de *B. firmus* cepa 37 para produzir a enzima. Portanto, mesmo que o micro-organismo necessite da fase de adaptação celular ao meio e às condições de cultivo, comum a todo início de produção enzimática com células microbianas, o que se concluiu foi que a produção de CGTase foi crescente com o tempo e com a sequência de bateladas, corroborando o que os autores citados concluíram.

Outras análises também foram investigadas como a variação de pH e da concentração de açúcares redutores totais durante a fermentação que foram correlacionadas com a atividade de CGTase (Figura 17), para compreender o que ocorre com estes parâmetros quando as células do micro-organismo estão no meio e nas condições de produção enzimática pré-estabelecidas.

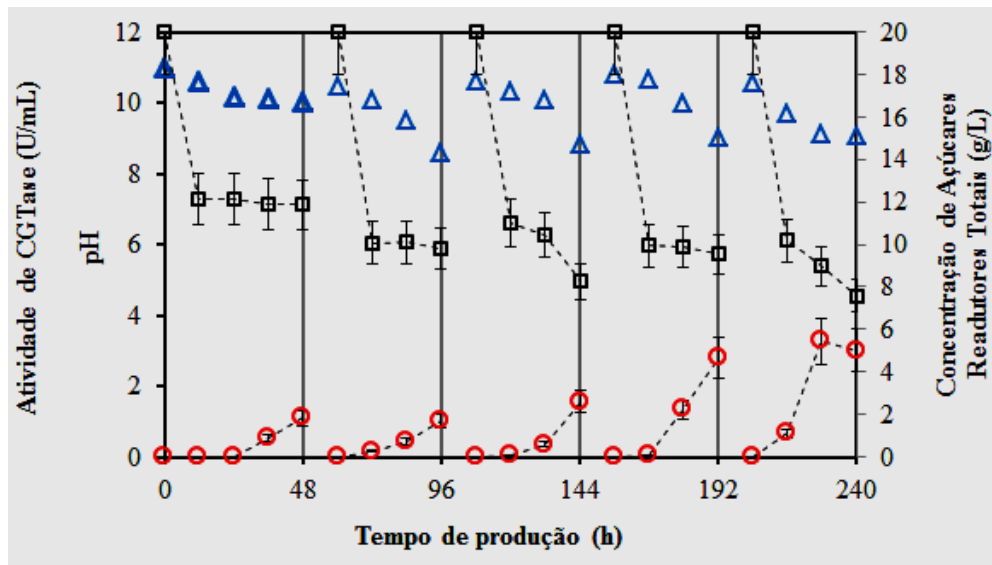


Figura 17 - Atividade de CGTase (círculo), pH (triângulo) e concentração de açúcares redutores totais (quadrado) em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado no carvão de osso, em cinco bateladas repetidas de 48 h, sendo que de 0 a 48 h perfaz a 1ª batelada, de 60 a 96 h a 2ª batelada, e assim sucessivamente.

Na Figura 17 foi possível verificar o comportamento do pH em cada batelada começando elevado entre 11,0 e 10,5 e terminando as bateladas com valores entre 10,0 e 8,8. O pH foi apenas monitorado e não controlado e por isso seu valor depende da degradação do carbonato de sódio, reagente que concede o pH básico ao meio. Este pH básico é o ideal para o cultivo do *B. firmus* cepa 37 (≥ 9), sua reprodução e para a produção de metabólitos e os valores estão de acordo com o esperado. Ainda na Figura 17 constatou-se que a concentração de açúcares redutores totais diminui com o tempo, pois os açúcares, amido utilizado no meio, são consumidos pelos micro-organismos para seu metabolismo. Observou-se ainda que a variação da concentração de açúcares foi inversamente proporcional à variação da concentração de CGTase, ou seja, o *B. firmus* cepa 37 consome os açúcares para a produção da enzima e este perfil pode ser verificado para todas as bateladas, em que os valores de

atividade de CGTase aumentam, enquanto que os de concentração de açúcares redutores totais diminuem com o tempo. Este perfil também está de acordo com o esperado, pois o bacilo consome o amido para realizar suas funções e quando este substrato encontra-se em quantidades menores no meio, o micro-organismo, por sua vez, redireciona seu metabolismo para a síntese de CGTase. A enzima excretada no meio pode ser utilizada única e exclusivamente pelo *B. firmus* cepa 37, quando necessário. Por isso, os máximos valores de atividade de CGTase foram encontrados ao final de cada batelada.

Comparando-se os valores de atividade enzimática com as células livres e as imobilizadas, constatou-se que os valores de atividade de CGTase com o *B. firmus* cepa 37 imobilizado em bateladas repetidas (1ª e 2ª = 1,10 U/mL; 3ª = 1,56 U/mL; 4ª = 2,8 U/mL e 5ª = 3,0 U/mL) são maiores que as atividades obtidas no ensaio realizado com as células livres do *B. firmus* cepa 37 em agitador orbital e sem suplementação de ar, que foram iguais a 0,6 U/mL em 48 h e 0,77 U/mL em 96 h de produção enzimática. Esses valores de atividade de CGTase demonstraram que a taxa de aeração (1 v/v/m), células imobilizadas no carvão de osso (7 g) e a melhor agitação do meio (leito fluidizado) foram essenciais para este aumento. Kuo e coautores (2009) estudaram a produção de CGTase em batelada com o *Bacillus* sp. livre no meio sem suplementação de ar e verificaram um valor de atividade enzimática muito elevada, em torno de 13 U/mL em 15 h, demonstrando que muitas vezes a imobilização microbiana pode impor barreiras em relação à transferência de massa, o que não ocorre quando a célula está livre no meio. Porém, as células livres, não permitem a produção em processo contínuo. Moriwaki e colaboradores (2009) estudando a produção enzimática, utilizando células livres de *Bacillus sphaericus* cepa 41 em batelada, conseguiram máxima atividade de CGTase em 120 h de apenas 0,048 U/mL. Todas estas comparações nos leva à análise de que são vários os fatores que podem interferir na produção enzimática. Segundo Ibrahim e coautores (2010) a qualidade e a origem do amido utilizado podem interferir na produção de enzima, pois o mesmo pode aumentar a viscosidade do meio, resultando em uma mistura imprópria, reduzindo a taxa de transferência de massa. Outros fatores são a imobilização, o suporte para a imobilização microbiana e a aeração do meio, que podem ser utilizados a fim de aumentar a produção enzimática em um tempo reduzido.

Com o objetivo de melhorar a produção enzimática, e com isso aumentar a atividade de CGTase, foram desenvolvidos ensaios de produção em que se explorou diferentes taxas de aeração e quantidades de carvão de osso (Seção 4.4.3).

4.4.3. Produção de CGTase em Única Batelada com Células Imobilizadas do *B. firmus* cepa 37 em Carvão de Osso Bovino

Em virtude da melhora na eficiência da produção de CGTase com o fornecimento de ar, foi testada uma única batelada, porém com um tempo maior de produção para determinar em qual tempo a produção enzimática é máxima e em qual ocorre a queda de produção. O início do ensaio obedeceu aos critérios descritos nas Seções 3.1.1 e 3.1.2 de Materiais e Métodos, com exceção de que não houve a diluição do meio utilizado para a imobilização celular e o volume foi de 1200 mL. A produção de CGTase teve duração total de 168 h utilizando suplementação de ar de 1 v/v/m, no frasco contendo o meio de produção e 7 g de carvão de osso na coluna do biorreator. Os resultados obtidos de atividades de CGTase encontram-se na Figura 18.

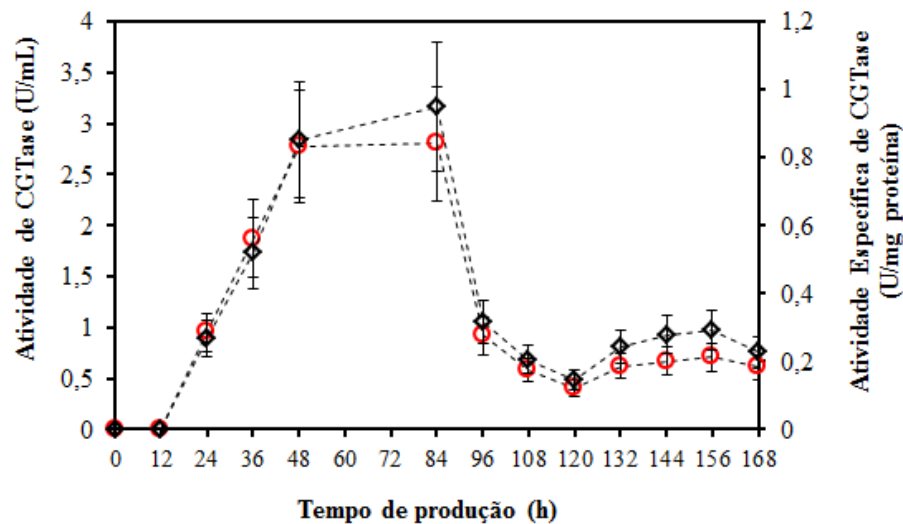


Figura 18 - Atividade de CGTase (círculo) e atividade específica de CGTase (losango) em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado no carvão de osso.

Na Figura 18 observou-se que os valores de atividade enzimática de CGTase e de atividade específica de CGTase são crescentes com o tempo até 48 h com pequeno aumento até 84 h, alcançando valores de aproximadamente 2,7 U/mL e 0,85 U/mg proteína (48 h) e 2,8 U/mL e 0,94 U/mg proteína (84 h). A partir de 84 h, houve diminuição de ambas as atividades enzimáticas, que sofreram recuperação parcial após 120 h e terminaram a produção de CGTase em 168 h com o valor da atividade de CGTase de 0,6 U/mL e da atividade específica de CGTase a 0,2 U/mg proteína. O aumento da atividade específica de CGTase juntamente com a atividade de CGTase está de acordo com Vassileva e colaboradores (2005) referindo que este aumento indica que condições de cultura estabelecidos fornece a síntese de proteína e, consequentemente de enzima. Vassileva e coautores (2003) trabalharam com *Bacillus*

circulans imobilizado em agar, em que a produção de CGTase ocorreu em batelada; os autores não utilizaram suplementação de ar e em 72 h de produção analisadas, a atividade de CGTase alcançou o valor de aproximadamente 0,15 U/mL. No mesmo tempo e utilizando a suplementação de ar de 1 v/v/m, a atividade enzimática no presente trabalho alcançou, aproximadamente, 3,0 U/mL (Figura 18).

A concentração de açúcares redutores totais e os valores de pH também foram determinados e monitorados durante todo o tempo de produção de enzima e o perfil obtido com essas medidas encontram-se na Figura 19.

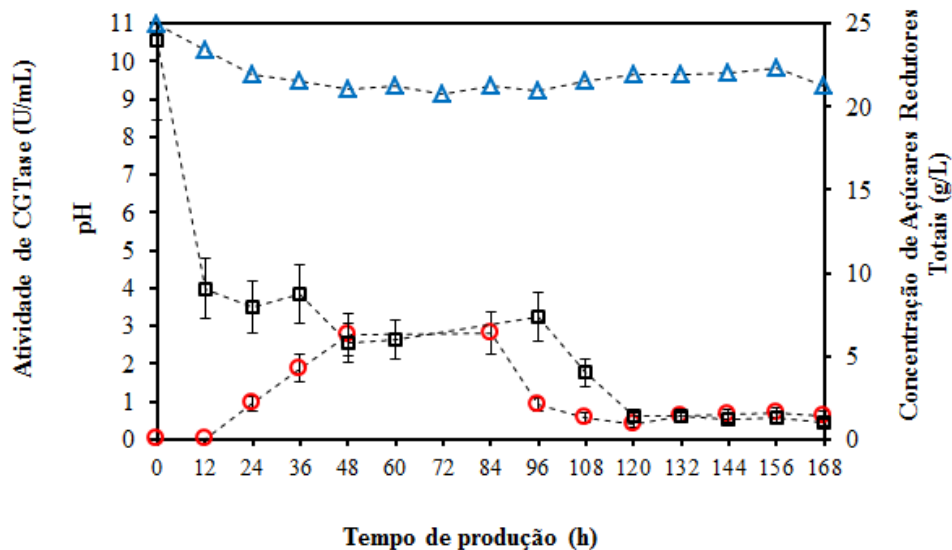


Figura 19 - Atividade de CGTase (círculo), pH (triângulo) e concentração de açúcares redutores totais (quadrado) em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado no carvão de osso.

Com relação à concentração de açúcares redutores, observa-se na Figura 19 uma queda ao longo do tempo, principalmente nas primeiras 12 h, em que a concentração inicial era igual a 24 g/L e nas primeiras horas diminuiu para 9 g/L de açúcares redutores totais e foi reduzindo até próximo de zero em 168 h analisadas. Este perfil está de acordo com o esperado, ou seja, o *B. firmus* cepa 37 consumiu o açúcar presente para o seu crescimento, reprodução, produção enzimática e para outras sínteses. Em relação ao pH, os valores variaram de 11 (0 h) até 9,3 (168 h) e também permaneceram com o comportamento

esperado, pois estes valores de pH estão acima de 9, que é o ideal para o cultivo do micro-organismo e para a CGTase, visto que de acordo com Dixon e Webb (1979), pelo fato de as enzimas serem proteínas, o caráter iônico dos grupos amino e carboxílicos da proteína é afetado pelas mudanças de pH.

Valores próximos de atividade de CGTase em torno de 2,8 U/mL foram encontrados no ensaio em bateladas repetidas, com as células também imobilizadas na mesma quantidade de carvão (7 g) e com a mesma taxa de aeração (1 v/v/m), mas somente na 4ª batelada (192 h) (Figura 16), então conclui-se que a produção de enzima em uma única batelada de 84 h foi melhor, pois em bateladas repetidas de 48 h precisou de quatro bateladas ou 192 h para obter a mesma atividade de CGTase. Assim, para os próximos ensaios com as células imobilizadas em diferentes quantidades de carvão e taxas de aeração optou-se em trabalhar com uma única batelada de 120 h, pois com este tempo seria possível determinar o máximo e o mínimo da produção de CGTase.

4.4.4. Estudo de Quantidades de Carvão de Osso Bovino e de Taxas de Aeração para a Produção de CGTase por Células Imobilizadas de *B. firmus* cepa 37

Iniciaram-se os ensaios com um estudo de planejamento de experimento analisando diferentes taxas de aeração e quantidades de carvão que poderiam ser testadas, a partir dos resultados alcançados nos ensaios anteriormente realizados. Portanto, sabia-se que a quantidade de 7 g de carvão de osso e o tempo de 24 h foram suficientes para a imobilização do micro-organismo, como também se verificou que a taxa de aeração de 1 v/v/m foi eficaz no cultivo do *Bacillus* para a produção de CGTase. Assim, decidiu-se testar uma quantidade maior de carvão de osso (14 g) e uma menor (3,5 g), assim como uma taxa de aeração maior (2 v/v/m) e uma menor (0,5 v/v/m).

Os resultados de produção de CGTase estão agrupados em relação à quantidade de carvão de osso, ou seja, as atividades de CGTase obtidas para os ensaios realizados com a quantidade de carvão igual a 3,5 g e para as três taxas de aeração (0,5; 1 e 2 v/v/m) encontram-se na Figura 20. Para a quantidade de carvão de osso de 7 g, na Figura 21 e para 14 g de carvão de osso na Figura 22.

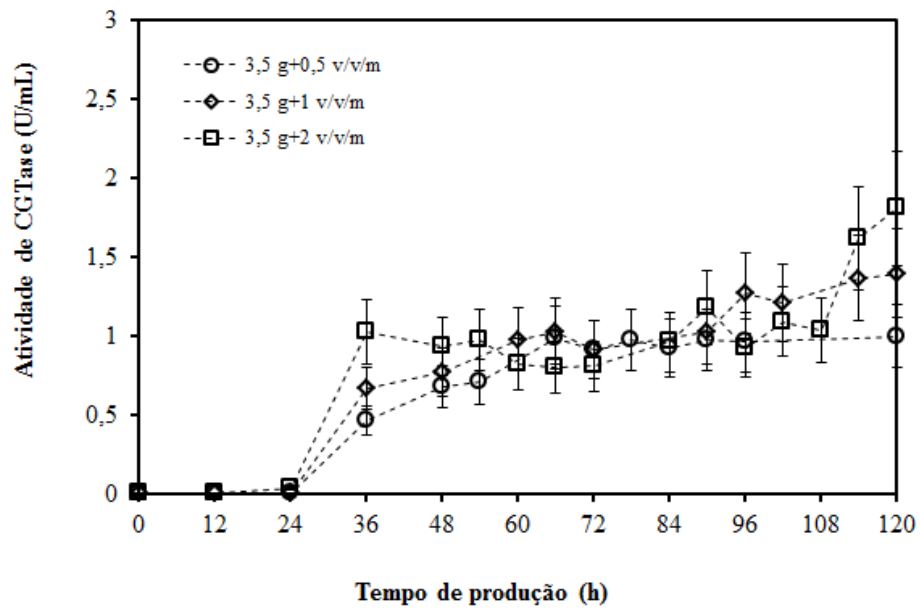


Figura 20 - Atividade de CGTase em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 3,5 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m.

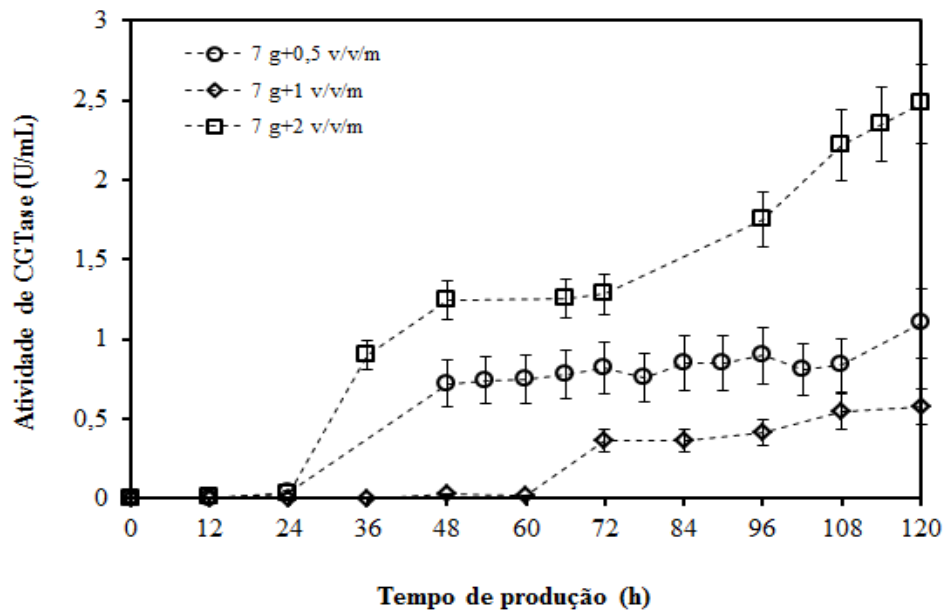


Figura 21 - Atividade de CGTase em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 7 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m.

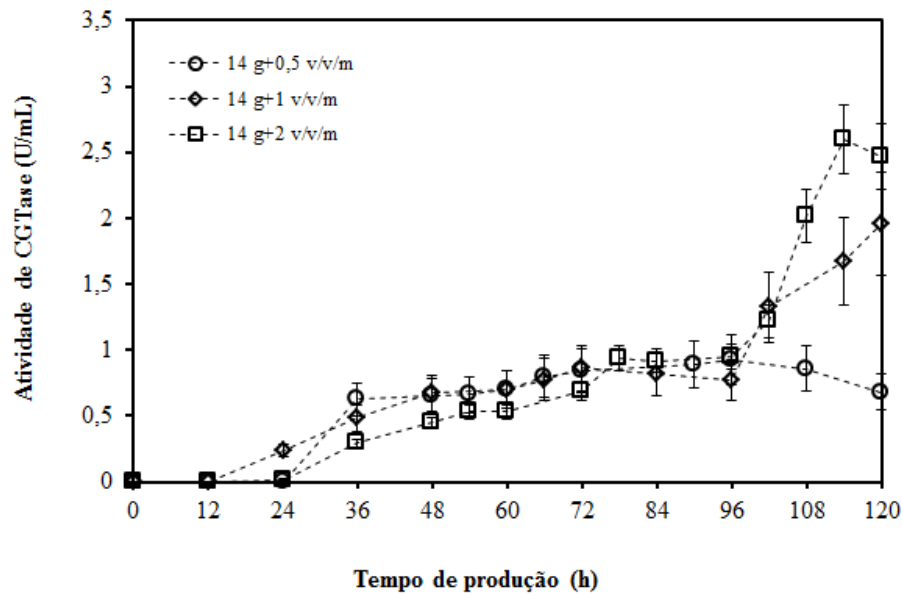


Figura 22 - Atividade de CGTase em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 14 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m.

Comparativamente, as maiores atividades de CGTase obtidas nas Figuras 20, 21 e 22 ao final de 120 h de produção, foram nos ensaios utilizando 7 e 14 g de carvão de osso e a maior taxa de aeração igual a 2 v/v/m, com valores iguais e próximos de 2,5 U/mL. Ou seja, a produção de CGTase foi mais eficiente utilizando a maior taxa de aeração do planejamento de experimentos com duas quantidades de carvão: a maior (14 g) e a intermediária (7 g). Verificou-se também que a maior atividade de CGTase igual a 1,8 U/mL da Figura 20 utilizando 3,5 g de carvão foi obtida com taxa de aeração mais elevada de 2 v/v/m, semelhante aos dois outros ensaios com 7 e 14 g. Portanto, constatou-se que o aumento do fornecimento de ar com a finalidade de melhorar a produção da CGTase com o *B. firmus* cepa 37 imobilizado foi importante para as três quantidades de carvão de osso, pois as maiores atividades enzimáticas foram com a maior taxa de aeração independente das quantidades de carvão usadas. Kunamneni e colaboradores (2007) utilizando o *Bacillus* sp., para a produção de CGTase, imobilizado em alginato de cálcio e aplicado em reator do tipo airlift, testaram taxas de aeração entre 0,5 e 3 v/v/m e relataram que a atividade enzimática foi mais elevada com a taxa de aeração de 2 v/v/m, como ocorreu neste trabalho. Os autores Pinto e colaboradores (2011) avaliaram os efeitos de diferentes taxas de aeração e agitação e concluíram que estes parâmetros são fatores decisivos para o crescimento microbiano e para a

produção enzimática e completaram ainda que a combinação de condições moderadas de aeração e velocidade de agitação possibilitam alta atividade enzimática.

Por outro lado, verificou-se que a quantidade de carvão também foi importante para o aumento das atividades de CGTase, pois acrescentando carvão de osso ao biorreator aumentou-se a área superficial para a imobilização dos micro-organismos. Isto pode ser comprovado quando os valores das atividades de CGTase obtidas com 3,5 g de carvão foram comparadas com as outras quantidades de carvão utilizadas, em que os valores mais altos de atividade de enzima, ao final da produção de 120 h, foram nos ensaios realizados com 7 e 14 g de carvão de osso. Ou seja, alcançou-se atividades de CGTase de aproximadamente 1,8; 1,4 e 1 U/mL (2; 1 e 0,5 v/v/m) utilizando-se 3,5 g de carvão de osso (Figura 20); para 7 g as atividades de enzima foram próximas a 2,5; 1,1 e 0,6 U/mL (2; 1 e 0,5 v/v/m) (Figura 21); e por fim as atividades de CGTase iguais a 2,5; 2 e 0,7 U/mL (2; 1 e 0,5 v/v/m) com 14 g de carvão de osso (Figura 22) para as taxas de aeração de 2; 1 e 0,5 v/v/m, respectivamente.

Atanavosa e colaboradores (2009) realizaram a imobilização de *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF e *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB, para a produção de CGTase, em agar gel contendo magnetita e os valores de atividade de CGTase obtidos foram 0,14 e 0,2 U/mL, respectivamente, muito abaixo dos encontrados neste trabalho. Atanasova e coautores (2011) caracterizaram e purificaram a CGTase da cepa *B. pseudocaliphilus* 20RF e verificaram atividade enzimática muito baixa de aproximadamente 0,007 U/mL para o extrato bruto, com a produção da enzima utilizando células do micro-organismo livres no meio. Depois da purificação da CGTase alcançou a atividade de 0,66 U/mL, próximo aos valores mínimos encontrados em neste trabalho para a enzima sem ser purificada.

Um fato importante, que pode ter contribuído para maiores atividades de CGTase foi a minimização das limitações difusionais, já que a imobilização microbiana ocorreu na superfície do carvão de osso. Abdel-Naby e coautores (2011) relataram que a imobilização celular, nos poros da matriz, pode impor barreiras difusionais, que são problemas não encontrados na produção enzimática com células livres. Porém, esses autores trabalharam com matrizes porosas como a quitosana, alginato de cálcio e agar, que podem verdadeiramente comprometer a transferência de massa. Pazzetto e colaboradores (2011) também reportaram que em grânulos de alginato as limitações de transferência de massa são mais severas, porém isto não foi observado com a esponja vegetal, onde os mesmos autores

imobilizaram *B. firmus* cepa 37 com produção de CGTase de 0,08 U/mL. De acordo com os mesmos autores, a esponja é altamente porosa e permite uma melhor distribuição celular, semelhante ao que ocorre em uma imobilização de micro-organismos na superfície de uma matriz porosa.

Outra discussão dos resultados de atividade de CGTase, mostrados nas Figuras 20, 21 e 22, para 3,5; 7 e 14 g de carvão de osso e 0,5; 1 e 2 v/v/m de taxa de aeração foi feita em relação à importância da quantidade de carvão de osso e do fornecimento de ar em função do tempo. Ou seja, utilizando-se 3,5 g de carvão (Figura 21) observou-se que as diferentes aerações não interferiram nas primeiras 24 h na atividade de CGTase, apenas entre 24 e 36 h e já no final da produção entre 108 e 120 h, as taxas de aeração de 0,5; 1 e 2 v/v/m foram significativas nas atividades de CGTase, pois entre 36 e 108 h as atividades de CGTase foram semelhantes e não houve aumentos expressivos dos valores neste intervalo. Este comportamento foi análogo ao que ocorreu com os outros ensaios utilizando 7 g (Figura 21) e 14 g (Figura 22), pois no começo da produção sempre há um período de adaptação dos micro-organismos ao meio e condições, em que não há produção de CGTase, depois há um aumento exponencial da atividade da enzima seguida da estabilização nos valores e novo aumento da produção enzimática até 120 h. Apenas no ensaio com 14 g e 0,5 v/v/m, não foi caracterizado este aumento no final da produção, mas sim a queda na atividade de CGTase, que pode ter ocorrido pela baixa taxa de aeração que não foi suficiente para a manutenção dos micro-organismos imobilizados no carvão e para a contínua produção de CGTase. Porém, na maioria dos ensaios o que se observou foi que a atividade da enzima alcançou valores mais altos ao final do tempo de produção de 120 h.

De acordo com Abdel-Naby e colaboradores (2011); Vassileva e colaboradores (2005, 2003) e Jamuna e colaboradores (1993), o que se esperava era uma atividade enzimática, em termos de produção de CGTase, crescente no início do processo e então, estabilização da produção por um período ou ciclos, e posterior decréscimo na atividade. Porém, em 120 h de produção investigada a atividade enzimática poderia ainda estar no seu período de avanço e só depois deste tempo de 120 h a atividade de CGTase poderia diminuir, revelando o perfil que os autores citados acima observaram. Como a atividade enzimática só foi analisada até 120 h não se pode afirmar que o perfil de produção enzimática em batelada com o reator de leito fluidizado e *B. firmus* cepa 37 imobilizado em carvão de osso foi diferente de outras produções enzimáticas já publicadas.

Outra hipótese interessante, é que se a atividade enzimática atinge seu valor máximo em 120 h, ou seja, ao final do tempo de produção analisado, pode-se dizer que essa alta atividade esteja relacionada com a baixa concentração de substrato do meio alcançada no final do teste. Isto é, o micro-organismo consome o amido para realizar suas funções metabólicas e de reprodução, quando este substrato encontra-se em quantidades menores no meio, o micro-organismo, por sua vez, redireciona seu metabolismo para a síntese de CGTase, que excretada no meio, pode ser utilizada única e exclusivamente pelo *B. firmus* cepa 37, como fonte de nutriente, quando necessário. Por isso, os máximos valores de atividade de CGTase encontrados no final do tempo de produção.

Outro fato importante observado por Martins e colaboradores (2003b) foi a inibição da atividade de CGTase por CDs formadas, durante a reação de ciclização de CGTase. Moriwaki e coautores (2009) confirmaram esta possibilidade, quando estudaram diferentes concentrações de CDs no meio de produção e verificaram inibição de enzima CGTase em todas as concentrações testadas.

Foram analisados também, os resultados de atividade específica de CGTase, que foram obtidos com os dados das concentrações de proteínas solúveis no meio e com os valores das atividades de CGTase alcançados durante 120 h e que também foram agrupados em relação às quantidades de carvão de osso e estão apresentados nas Figuras 23 (3,5 g), 24 (7 g) e 25 (14 g) para as taxas de aeração iguais a 0,5; 1 e 2 v/v/m.

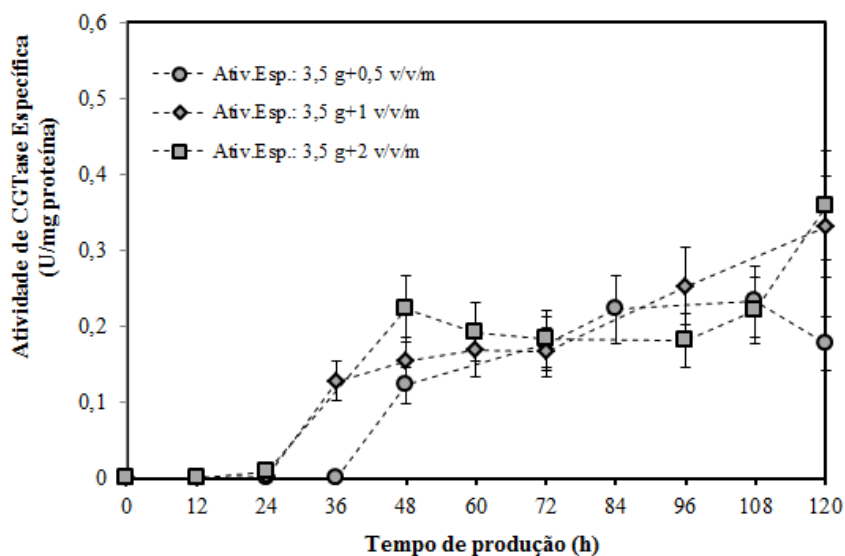


Figura 23 - Atividade específica de CGTase em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 3,5 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m.

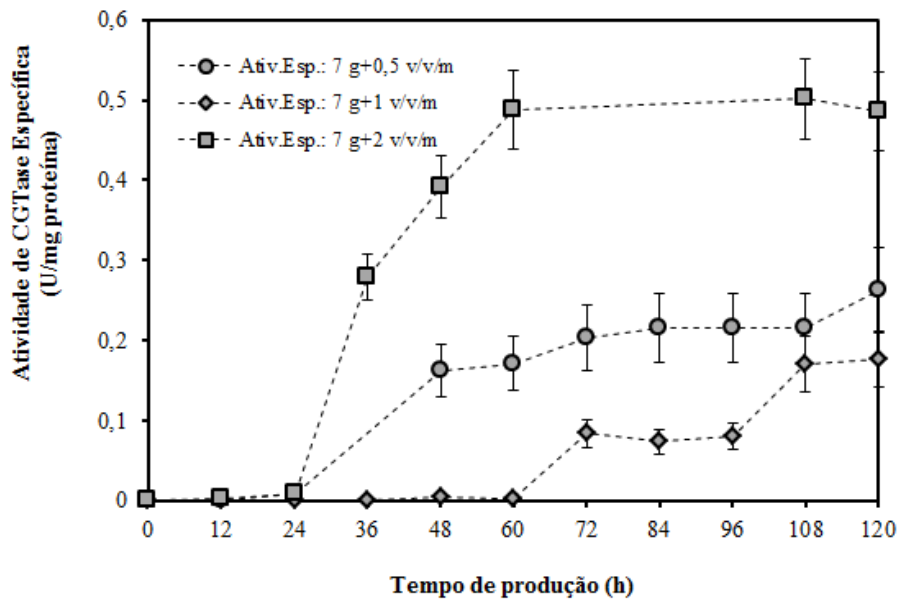


Figura 24 - Atividade específica de CGTase em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 7 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m.

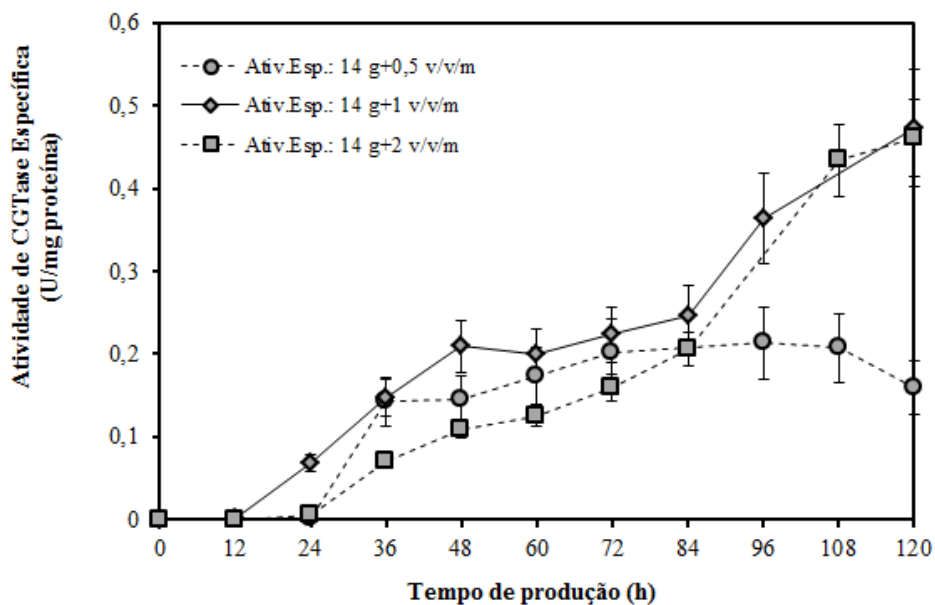


Figura 25 - Atividade específica de CGTase em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 14 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m.

Como se observa nas Figuras 23, 24 e 25 a atividade específica de CGTase aumenta com o tempo de produção e apresenta perfil semelhante à produção da enzima (Figuras 20, 21

e 22), pois depende da atividade de CGTase. Depende também da concentração de proteínas solúveis, que diminui com o tempo, pois os micro-organismos consomem as proteínas presentes no meio para o seu metabolismo, porém de acordo com Atanasova e colaboradores (2009), a CGTase é uma enzima extracelular e a atividade específica de CGTase (U/mg proteína) mostrou que parte da proteína total foi enzima. Muitas vezes o que fica estabelecido é que altas quantidades de atividade de CGTase (U/mL), na presença de elevadas quantidades de proteínas totais pode significar menores quantidades de atividade específica, isto é, menos enzima estará no meio de produção. Entretanto, as concentrações de proteínas solúveis diminuíram com o tempo e a produção enzimática aumentou, assim os valores de atividade específica de CGTase também aumentaram.

As concentrações de açúcares redutores totais e o pH também foram monitorados e os resultados encontram-se nas Figuras 26, 27 e 28, para 3,5; 7 e 14 g, respectivamente, nas três aerações testadas (0,5; 1 e 2 v/v/m).

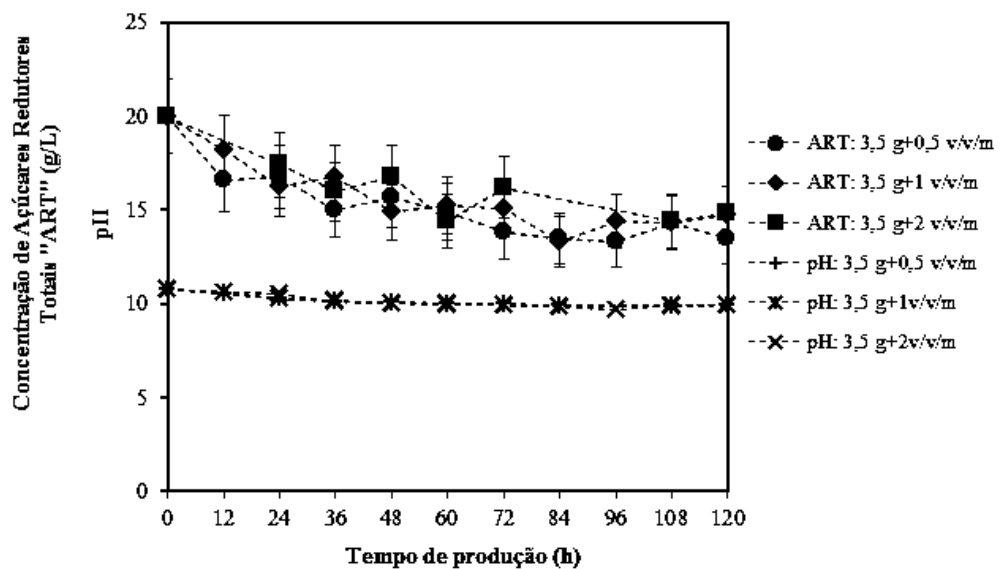


Figura 26 - Concentração de açúcares redutores totais e pH em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 3,5 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m.

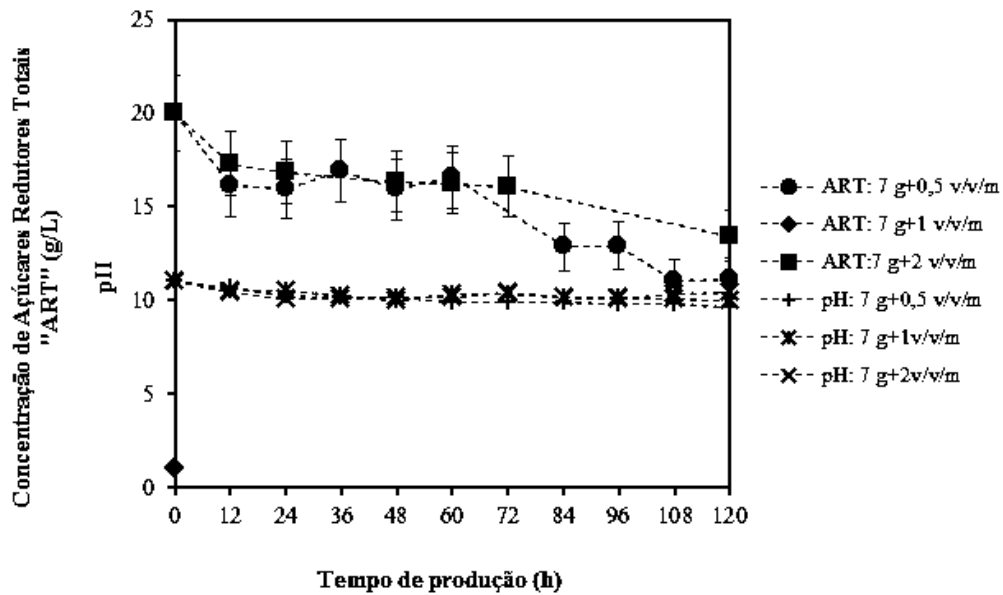


Figura 27 - Concentração de açúcares redutores totais e pH em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 7 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m.

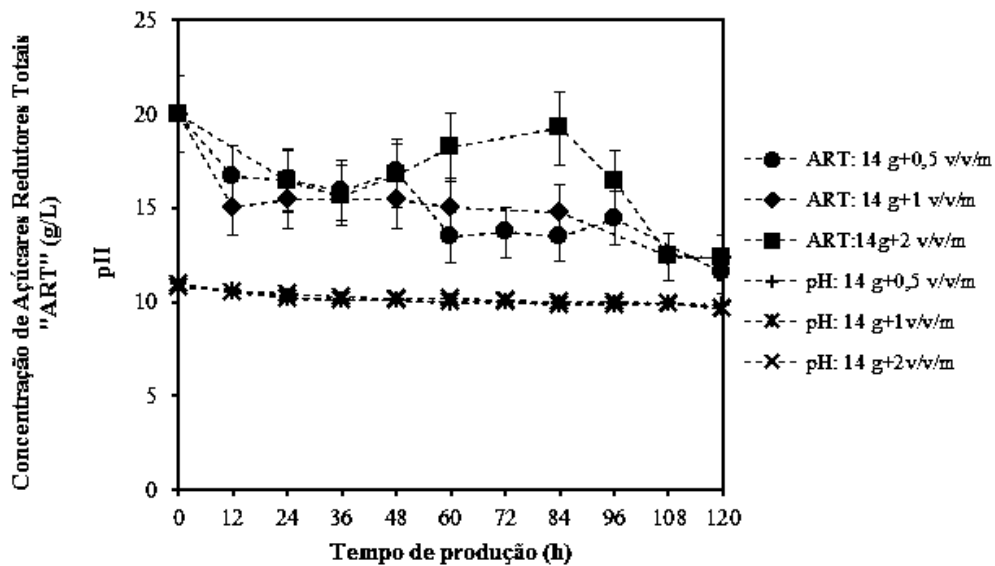


Figura 28 - Concentração de açúcares redutores totais e pH em função do tempo de produção enzimática com *B. firmus* cepa 37 imobilizado em 14 g de carvão de osso e taxas de aeração de 0,5; 1; 2 v/v/m.

Com relação à concentração de açúcares redutores totais, observou-se uma queda ao longo do tempo iniciando em 20 g/L e terminando a produção com aproximadamente 15 g/L, para todos os ensaios, como se verificou nas Figuras 26, 27 e 28. Este perfil está de acordo com o esperado, ou seja, o *B. firmus* cepa 37, está consumindo o açúcar presente para o seu

crecimento, reprodução, produção enzimática e para outras sínteses realizadas pelo micro-organismo. Avaliando os valores de pH, constatou-se que permaneceram em uma faixa alcalina variando entre 11 e 9,5, durante toda a produção e para todos os ensaios. Este comportamento esteve de acordo com o esperado, já que é conhecido que para o *B. firmus*, cepa 37 o pH ótimo do meio situa-se acima de 9 (MATIOLI, 1997).

4.4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 29 ilustra as análises de microscopia eletrônica de varredura realizadas, com a finalidade de complementar a caracterização do carvão de osso, nas amostras sem células microbianas imobilizadas e com *B. firmus* cepa 37 imobilizado para a condição de produção de CGTase que utilizou 7 g de carvão e 0,5;1 e 2 v/v/m de taxas de aeração.

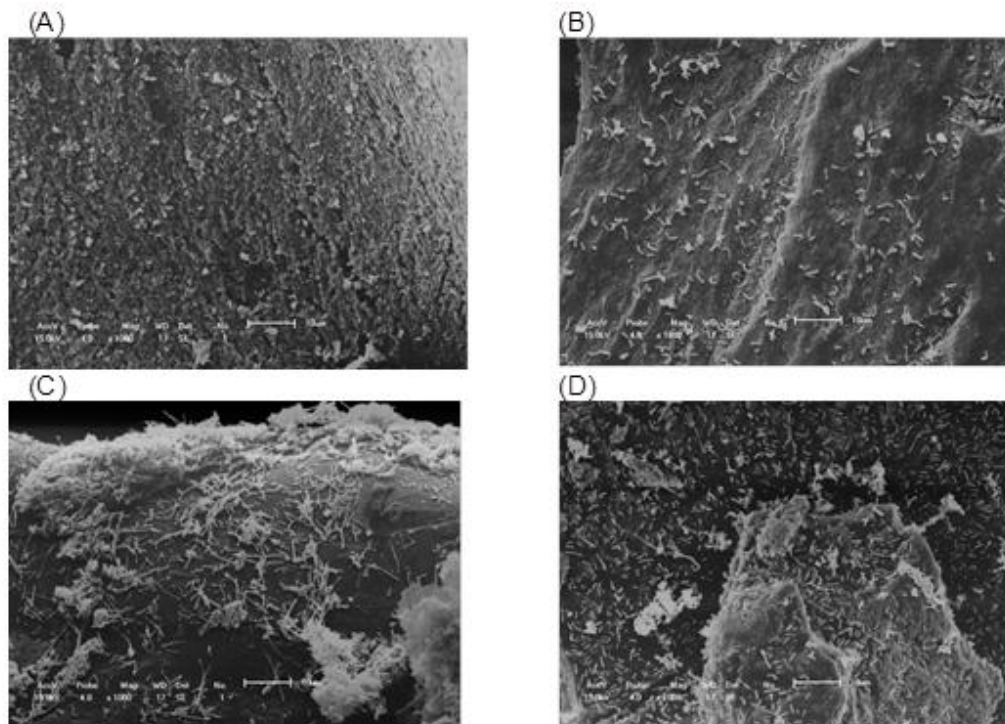


Figura 29 - Análises de microscopia eletrônica de varredura (x 1000) das partículas de carvão de osso sem células microbianas imobilizadas (A); Carvão de osso com células microbianas imobilizadas em diferentes taxas de aeração: 0,5 v/v/m (B); 1 v/v/m (C) e 2 v/v/m (D).

A microscopia da partícula de carvão ativado de osso (Figura 29 A) mostra grande quantidade de rugosidades e também microporos. A microporosidade do carvão está de acordo com o valor do diâmetro médio dos poros encontrado em nesta pesquisa (89,85 Å ou $0,008985 \times 10^{-4} \mu\text{m}$), pois os poros são classificados como microporos valores de poros menores que 2 nm ou $2 \times 10^{-6} \text{ mm}$. Além disso, as microscopias das biopartículas (carvão de osso + células microbianas imobilizadas) (Figuras 29 B, C e D) mostram micro-organismos com formato semelhante a bastonetes, provavelmente *B. firmus* cepa 37, aderidos ao carvão ativado de osso (partes escuras), comprovando o sucesso do processo de imobilização celular. Portanto, considerando-se que o diâmetro dos poros do carvão é muitas vezes menor que a bactéria em estudo (bastonetes de $0,5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$), concluiu-se que a possibilidade de *B. firmus* cepa 37 ficar aderido no interior dos poros do suporte foi remota, a não ser na presença de rugosidades no carvão de osso em que os micro-organismos possam se acomodar, se reproduzir e produzir enzima. Isto significa que a imobilização da maioria das células microbianas ocorreu por adsorção na superfície do carvão ativado de osso.

4.4.6. Planejamento Fatorial e Superfície de Resposta

A influência das variáveis independentes: quantidades de carvão de osso e das taxas de aeração sobre a variável dependente: atividade de CGTase, também foram analisadas por um planejamento de experimentos 3^2 , ao final da produção em 120 h e o projeto fatorial está na Tabela 10.

Tabela 10 - Planejamento de experimento com duas variáveis independentes: quantidades de carvão de osso e taxas de aeração e três níveis e a variável resposta: atividade de CGTase.

Ensaio	Variáveis independentes				Variável dependente
	Carvão de osso		Taxa de aeração		Atividade de CGTase (U/mL)
	(g)	Níveis	(v/v/m)	Níveis	
1	3,5	-1	0,5	-1	1,00
2	3,5	-1	1	0	1,40
3	3,5	-1	2	1	1,80
4	7	0	0,5	-1	1,10
5	7	0	1	0	0,50
6	7	0	2	1	2,50
7	14	1	0,5	-1	0,70
8	14	1	1	0	2,00
9	14	1	2	1	2,50

A partir da identificação das variáveis independentes e da variável resposta ou dependente (Tabela 10) foi possível realizar os cálculos do planejamento de experimentos, em que a significância estatística do modelo quadrático proposto foi determinada pelo F -valor (Tabela 11), que por sua vez, indica a influência ou não das variáveis independentes (carvão de osso e aeração) testadas, sobre a variável resposta (atividade de CGTase) (RAUF *et al.*, 2008).

Tabela 11 - Análises de variância (ANOVA) dos efeitos da quantidade de carvão de osso e da taxa de aeração na atividade de CGTase baseada no modelo quadrático.

Fatores	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Estatística, F	p -valor
x, carvão de osso	0,2078	1	0,2078	0,5410	0,5152
x^2	0,0402	1	0,0402	0,1047	0,7674
y, taxa de aeração	2,7896	1	2,7896	7,2626	0,0741
y^2	0,0116	1	0,0116	0,0303	0,8727
xy	0,1543	1	0,1543	0,4018	0,5711
$x + x^2$	0,2926	2	0,1463	0,3809	0,7121
$y + y^2$	2,9733	2	1,4866	3,8704	0,1476
$(x+x^2) * (y+y^2)$	0,1543	1	0,1543	0,4018	0,5711
Erro	1,1523	3	0,3841		
Total	4,4000	8			

Verificou-se pela Tabela 11 que a quantidade de carvão de osso não é significativa, mas a taxa de aeração é significativa para 90 % de confiança, pois p -valor $< 0,1$ com $F_{\text{calculado}} (7,57) > F_{\text{tabelado}} (4.19)$, portanto o modelo estimado ajustou-se adequadamente aos dados experimentais. Porém o coeficiente de determinação R^2 do modelo foi igual a 0,74, indicando que 26 % do total da variação não foram explicadas pelo modelo. No entanto, uma variação aproximada foi considerada no desvio padrão (10-20 %) dos dados experimentais apresentados nas Figuras 21, 22 e 23, confirmando pelo planejamento de experimentos que este valor do desvio estava correto. Com a análise de variância realizada da atividade de CGTase (Tabela 11) foi possível obter os termos da equação do modelo de segunda ordem, descrita pela Equação 4.1.

$$z = +1,18 - 0,127x + 0,05x^2 + 0,107y + 0,155y^2 + 0,048xy \quad (4.1)$$

Os coeficientes positivos da Equação 4.1, isto é: o coeficiente quadrático da quantidade de carvão de osso ($0,05x^2$), coeficientes linear e quadrático da taxa de aeração ($0,107y$ e $0,155y^2$) e a interação dessas duas variáveis ($0,048xy$) aumentam a atividade de CGTase, já o coeficiente negativo da equação (coeficiente linear da quantidade de carvão de osso) indicaria efeito inibitório (RAUF *et al.*, 2008; BLANCO *et al.*, 2011). Assim, o modelo estatístico revela que aumentando todas as variáveis, exceto a quantidade de carvão de osso de forma linear, haverá um aumento nos valores da atividade enzimática para o ponto de 120 h. Mas como o coeficiente de y^2 (taxa de aeração quadrática) foi o maior (0,155) e valor de F (Tabela 11) para a aeração também foi o maior valor (7,26), a variável independente taxa de aeração foi a que possuiu maior efeito na atividade de CGTase. Além disso, esses efeitos na atividade de CGTase dos fatores examinados (carvão de osso) e (aeração), de acordo com o planejamento de experimentos 3^2 , também foram analisados estatisticamente e os resultados estão na Tabela 12.

Tabela 12 - Análise estatística dos efeitos estimados do planejamento de experimentos 3^2 .

Fatores	Erro padrão	Coefficiente	t-valor	p-valor
Média / interação	0,210412	1,594931	7,580040	0,004763
x, carvão de osso	0,510375	0,187713	0,735587	0,515274
x^2	0,446283	-0,072222	-0,323661	0,767445
y, taxa de aeração	0,510375	0,687713	2,694930	0,074104
y^2	0,446283	-0,038889	-0,174279	0,872743
xy	0,597632	0,189413	0,633880	0,571189

Os valores de t , mostrados na Tabela 12, positivos para o efeito na atividade de CGTase são as variáveis: carvão de osso e taxa de aeração (coeficientes lineares x e y), como também a interação entre esses dois fatores (xy) e a média. O t -test é uma avaliação da probabilidade de encontrar o efeito observado e qual é a importância numérica (AHMED e EL-REFAI, 2010), ou seja, nestes experimentos a variável com o intervalo de confiança maior que 90 %, ou com o p -valor menor que 0,1 será significativa e para este planejamento a variável taxa de aeração foi significativa com o t -valor igual a 2,69. Esses efeitos descritos pelo t -valor foram dimensionados de acordo com a sua importância e o gráfico de *pareto* (Figura 30) construído no software Statistica 7.1 possibilitou a visualização.

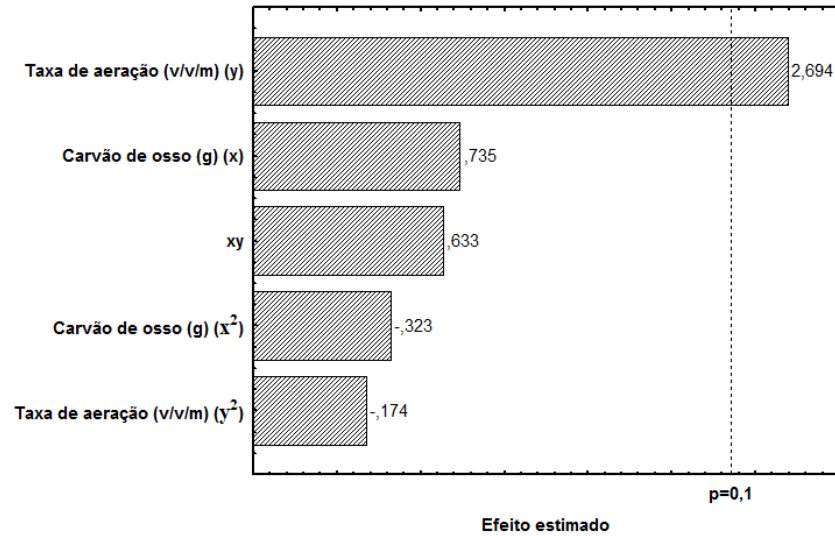


Figura 30 - Efeito da quantidade de carvão e da taxa de aeração na atividade de CGTase produzida por *B. firmus* cepa 37 imobilizado em carvão de osso, baseado nos resultados do planejamento 3².

Como exposto na Figura 30 a taxa de aeração (y), como um dos coeficientes lineares da equação do modelo quadrático, foi confirmada como a variável com efeito mais importante (p-valor < 0,1). O segundo efeito mais importante é a quantidade de carvão de osso (y), porém não ficou dentro do limite de confiança de 90 %.

A Figura 31 apresenta a curva de superfície de resposta para a variação na atividade de CGTase.

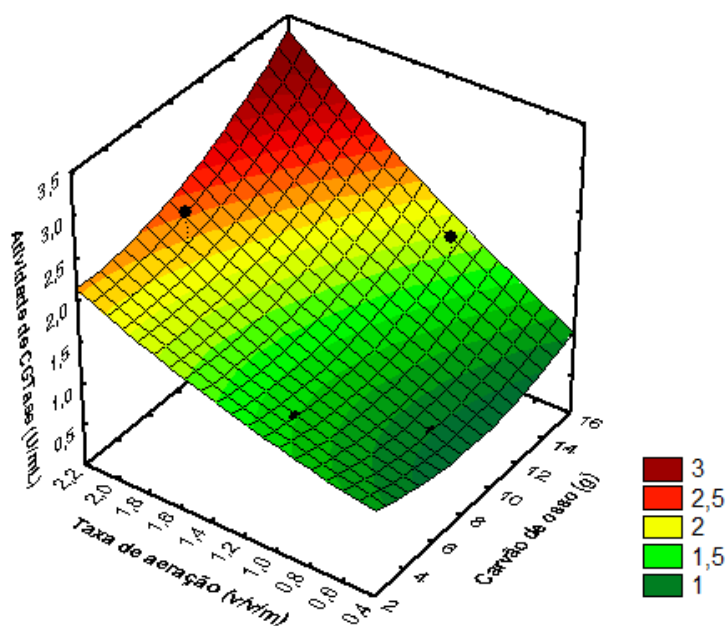


Figura 31 - Superfície de resposta mostrando o efeito simultâneo da quantidade de carvão e da taxa de aeração na atividade de CGTase, baseado nos resultados do planejamento 3².

Ao utilizar a superfície de resposta, a interação das duas variáveis independentes tornou-se mais fácil de ser compreendida, pois na Figura 31 foi possível visualizar que os aumentos da taxa de aeração de 0,5 v/v/m para 2 v/v/m, assim como da quantidade de carvão de osso de 3,5 g para 14 g contribuíram para a elevação da atividade de CGTase e consequentemente maior produção da enzima no meio. Assim, o modelo estatístico revelou que aumentando todas as variáveis independentes haverá um aumento nos valores da atividade enzimática para o ponto de 120 h. Ou seja, além do planejamento de experimentos ratificar que a taxa de aeração é a variável que mais afetou a produção de CGTase, mostrou que a quantidade de carvão de osso também teve sua importância estatística, pois com o aumento do carvão de osso também houve acréscimo na atividade enzimática. Então, como a quantidade de carvão teve sua importância na produção de enzima, e como *B. firmus* cepa 37 é o único produtor da enzima no meio, concluiu-se que os micro-organismos produtores foram os que se encontravam imobilizados no carvão de osso. Ou seja, os micro-organismos imobilizados tiveram mais importância na produção de CGTase do que as células microbianas que sofreram dessorção e que estavam livres em suspensão. De fato, Atanasova e colaboradores (2009) comprovaram esta afirmação, pois os mesmos autores trabalharam com a imobilização microbiana em membranas poliméricas e verificaram, que havia liberação de células do suporte para o meio, como ocorreu nesta pesquisa. Uma vez que a imobilização do *B. firmus* cepa 37 ocorreu através da adsorção, ficaram as células aderidas mais na superfície da partícula do que nos poros do carvão. Com isso as células do micro-organismo ficaram mais expostas aos estresses do processo, ou seja, devido ao próprio leite fluidizado aplicado e as fracas ligações entre o micro-organismo e o carvão de osso, houve dessorção de uma parte das células, que ficaram suspensas no meio e que possivelmente também foram responsáveis pela produção de CGTase. Porém, os mesmos autores constataram que as células liberadas foram células vegetativas, encontradas no início da fase de crescimento exponencial, e que não poderiam realizar a síntese de enzima, ao contrário das células cultivadas livres no meio, nas mesmas condições, em que predominam as células na fase final do crescimento exponencial. Além disso, a maior quantidade de carvão possibilitou o aumento da área superficial disponível para a imobilização celular microbiana.

Portanto, com a conclusão que maiores quantidades de carvão de osso e taxas de aeração poderiam aumentar a produção de CGTase, realizou-se um ensaio em que a quantidade de carvão de osso utilizada foi de 28 g e a aeração foi de 4 v/v/m, ou seja, duplicaram-se os maiores valores usados anteriormente de carvão (14 g) e taxa de aeração

(2 v/v/m). Os resultados obtidos de atividade de CGTase não foram diferentes dos melhores valores alcançados com 14 g e 2 v/v/m, porém esses resultados foram obtidos muito mais rapidamente, ou seja, para conseguir a atividade de CGTase aproximada dos outros ensaios ($\pm 2,5$ U/mL) foi necessário apenas 60 h de produção e não 120 h. No entanto, como este ensaio (28 g e 4 v/v/m) foi realizado uma única vez, há a necessidade de um planejamento de experimentos com quantidades maiores de carvão e aeração, para a confirmação dos resultados e para determinar qual ou quais as quantidades de carvão de osso e taxas de aeração são ideais para uma alta produção de CGTase em um menor tempo.

O ensaio (28 g e 4 v/v/m) possibilitou concluir que tanto a quantidade de carvão de osso e de aeração utilizados nos ensaios anteriores (com 3,5, 7 e 14 g de carvão e 0,5, 1 e 2 v/v/m de aeração) não foram suficientes para a produção de CGTase em um tempo menor que 120 h. Além disso, mediu-se com o auxílio de um medidor de oxigênio dissolvido (oxímetro) a porcentagem de saturação de oxigênio no meio de produção que estava em 0 %. Foram sugeridas duas possibilidades para o ocorrido: 1) todo o oxigênio do ar fornecido para o meio estava sendo consumido pelos micro-organismos ou 2) o ar bombeado não estava sendo dissolvido eficientemente no meio, dificultando a transferência de oxigênio do meio para os micro-organismos. Uma alternativa para melhorar a quantidade de oxigênio dissolvido no meio, sem alterar a vazão de ar, seria o uso de difusores de ar, que aumentariam a concentração de O₂. Assim, com mais oxigênio dissolvido no meio a transferência de massa para as células imobilizadas no carvão de osso dentro da coluna poderia ser melhorada, impulsionando a produção de CGTase e reduzindo o tempo de obtenção de uma alta atividade enzimática.

Gawande e Patkar (2001) estudaram a produção de CGTase com *Klebsiella pneumoniae* AS-22, utilizando a combinação de agitação e aeração, e concluíram que a síntese de CGTase foi melhor em níveis elevados das duas variáveis. Todavia, não se pode utilizar uma taxa de aeração muito elevada, ou melhor, não se deve saturar demais o meio com oxigênio dissolvido, pois de acordo com Blanco e colaboradores (2011) e Moriwaki e colaboradores (2009) a aeração pode favorecer o crescimento microbiano em detrimento da produção de CGTase, pois o acúmulo de células na superfície do suporte forma biofilmes, dificultando a transferência de substrato e oxigênio para as células nas camadas interiores do biofilme e assim, restringindo a produção enzimática.

Estes resultados podem ser usados em trabalhos futuros, pois a redução do tempo de produção de CGTase para 60 h e a atividade enzimática alcançada de 2,5 U/mL são implicações que tornaram o processo efetivo para a produção da enzima.

As considerações finais da pesquisa incluíram o estudo da produção de CGTase com células livres de *B. firmus* cepa 37 em agitador orbital e sem aeração alcançou atividade enzimática de 0,77 U/mL em 96 h. Além disso, esta produção foi importante, pois se identificou a fase de crescimento microbiano (entre 12 e 72 h) e que permitiu estabelecer um tempo de imobilização do micro-organismo no carvão de osso de 24 h. Porém, antes da imobilização do *B. firmus* cepa 37 no carvão de osso foi realizada a caracterização do suporte, o qual apresentou área superficial específica de 123,5 m²/g, volume total dos poros igual a 0,277 cm³/g e diâmetro médio dos poros de 89,85 Å (0,008985 x 10⁻⁴ μm). Considerando-se que o diâmetro dos poros do carvão é muitas vezes menor que a bactéria em estudo (0,5 μm x 5,0 μm), concluiu-se que a imobilização da maioria das células microbianas ocorreu por adsorção na superfície do carvão ativado de osso, o que pode ser comparado pela microscopia eletrônica de varredura. E para uma melhor compreensão do comportamento da CGTase na presença do carvão de osso, foi efetivado o estudo de adsorção da enzima no carvão e mostrou que essa não é adsorvida no mesmo assim, foi possível quantificar a enzima produzida pelo micro-organismo, já que essa permanecia em solução.

Com as caracterizações do carvão de osso e do leite fluidizado foi possível estudar a produção de CGTase com o micro-organismo imobilizado em carvão de osso (7 g), taxa de aeração de 1 v/v/m, em bateladas repetidas e biorreator de leite fluidizado. Mostrou que a produção foi crescente com o tempo e com a sequência de bateladas. Assim, nas 3^a (144 h), 4^a (192 h) e 5^a (240 h) bateladas, as atividades de CGTase aumentaram progressivamente, com valores iguais a 1,5; 2,8 e 3,0 U/mL. Então, mesmo que o micro-organismo necessite da fase de adaptação celular ao meio e as condições de cultivo, esta adaptação em bateladas repetidas foi mais rápida. Estudo de produção enzimática realizado em uma única batelada com um tempo de 168 h e mostrou que a máxima atividade de CGTase (2,8 U/mL) ocorreu entre os tempos de 48 e 84 h. Por isso, ensaios com as células imobilizadas em diferentes quantidades de carvão de osso e taxas de aeração foram realizados com uma única batelada de 120 h.

Objetivando melhorar a atividade de CGTase no meio foram realizadas produções da enzima em três quantidades avaliadas de carvão de osso (3,5; 7 e 14 g) e três taxas de aeração

(0,5; 1 e 2 v/v/m). Estes ensaios revelaram que os aumentos da taxa de aeração e da quantidade de carvão de osso contribuíram para a elevação da atividade de CGTase. O modelo estatístico empregado serviu para ratificar que além da taxa de aeração ser a variável que mais afetou a produção de CGTase, mostrou também que a quantidade de carvão de osso teve sua importância estatística, pois com o aumento da massa de carvão de osso no biorreator houve acréscimo na atividade enzimática. Portanto, foi realizado um ensaio utilizando 28 g de carvão de osso e aeração de 4 v/v/m, com a finalidade de alcançar a máxima atividade de CGTase. A tentativa revelou que os maiores valores das variáveis independentes não aumentaram a atividade de CGTase, mas diminuíram o tempo de produção para 60 h. O resultado encontrado sugere que o processo de produção de CGTase pode se tornar mais econômico, pois é possível reduzir o tempo de produção pela metade.

As conclusões indicaram que foi possível a produção de CGTase com altos valores de atividade enzimática, porém mais estudos em relação a diferentes quantidades de carvão de osso e de taxas de aeração devem ser feitos, para encontrar as condições ainda mais eficientes para a produção da enzima.

5. CONCLUSÕES

O objetivo principal da pesquisa foi atingido, pois foi possível a produção de CGTase em batelada, com biorreator de leite fluidizado, utilizando o *B. firmus* cepa 37 imobilizado em carvão ativado de osso bovino, um suporte inovador para esta finalidade.

Além disso, verificou-se no estudo utilizando diferentes quantidades de carvão de osso (3,5; 7 e 14 g) e de taxas de aeração (0,5; 1 e 2 v/v/m), que a quantidade intermediária de carvão de osso (7 g) utilizando a máxima taxa de aeração (2 v/v/m), foi o ensaio que obteve valores de atividade de CGTase mais significativos, ou seja, atividade enzimática de 1,75 U/mL em 96 h. Em contraste, para os ensaios com o micro-organismo livre no meio e sem aeração, a atividade de CGTase foi de 0,7 U/mL em 96 h, portanto concluiu-se que: a aeração, a imobilização do bacilos no carvão de osso e o uso do biorreator de leite fluidizado foram fundamentais para o aumento da atividade enzimática.

E ainda, o planejamento de experimento realizado com as três quantidades de carvão de osso e com as três taxas de aeração no final da produção (120 h) confirmou que a taxa de aeração é a variável que mais afetou a produção de CGTase, mas mostrou que a quantidade de carvão de osso também teve sua importância estatística.

O ensaio realizado utilizando 28 g de carvão de osso e aeração de 4 v/v/m, revelou que os maiores valores das variáveis independentes não aumentaram a atividade de CGTase, mas diminuíram o tempo de produção para 60 h. O resultado encontrado sugere que o processo de produção de CGTase pode se tornar mais econômico, pois é possível reduzir o tempo de produção pela metade.

Esta pesquisa mostrou que é possível a produção de CGTase a partir de *B. firmus* cepa 37 imobilizado em carvão de osso com elevada atividade enzimática. Porém, mais estudos relacionados a quantidades de carvão de osso e taxas de aeração devem ser feitos para otimizar a produção da enzima e tornar o processo de produção, em biorreator de leite fluidizado, atrativo no ponto de vista técnico-econômico.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- 1) Testar diferentes tempos de imobilização do *B. firmus* cepa 37 e diferentes massas de carvão de osso.
- 2) Testar a aeração do biorreator com difusor de ar situado dentro da coluna de leito fluidizado e reduzir, ou eliminar, o reservatório do meio fora do leito fluidizado.
- 3) Usar duas colunas em série, a primeira uma coluna de bolhas, para oxigenação do meio de cultura com microbolhas de ar esterilizado e a segunda de leito fluidizado, com o micro-organismo imobilizado, para a produção de CGTase.
- 4) Examinar diferentes concentrações iniciais de amido no meio.
- 5) Estudar a estabilidade operacional.
- 6) Estudar a estabilidade de armazenamento da enzima.
- 7) Estudar o tipo de interação entre o carvão e o *B. firmus* cepa 37 (FTIR-ATR).
- 8) Avaliar a concentração celular adsorvida ao carvão de osso ao longo do cultivo.

7. REFERÊNCIAS

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*, v. 5, p. 1-9, 2000.

ABDEL-NABY, M. A.; EL-REFAI, H. A.; ABDEL-FATTAH, A. F. Biosynthesis of cyclodextrin glucosyltransferase by the free and immobilized cells of *Bacillus cereus* NRC7 in batch and continuous cultures. *Applied Microbiology*, v. 111, p. 1129-1137, 2011.

AHMED E. M., EL-REFAI, H. A. Cyclodextrin glucosyltransferase production by *Bacillus megaterium* NCR: evaluation and optimization of culture conditions using factorial design. *Indian Journal Microbiology*, v. 50, p. 303–308, 2010.

AGUIAR, C. L. Ciclodextrina glicosiltransferase, produção, ação e aplicação. *B.ceppa, Curitiba*, v. 19, n. 1, p.119-138, 2001.

AI-NOI, S.; ABD-AZIZ, S.; ALITHEEN, N.; HASSAN, O.; KARIM, M. I. A. Optimization Cyclodextrin Glycosyltransferase Production by Response Surface Methodology Approach. *Biotechnology*, v. 7, n. 1, p.10-18, 2008.

AKIN, C. Biocatalysis with immobilized cells. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 5, p. 319-367, 1987.

ALVES, L. B.; MATIOLI, G.; MORAES, F. de M.; ZANIN, G. M.; OLIVO, J. E. 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. da. Evaluation of Solid and Submerged Fermentations for the Production of Cyclodextrin Glycosyltransferase by *PaeniBacillus campinasensis* H69-3 and Characterization of Crude Enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 129-132, p.234-246, 2006.

ALEXANDRA, T. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, n. 8, p. 678-686, 1998.

ANDREAUS, J; DALMOLIN, M. C.; JUNIOR, O. I. B. de; BARCELLOS, I. O. Aplicação de ciclodextrinas em processos têxteis, *Química Nova*, v. 33, n. 4, p. 929-937, 2010.

ARMSTRONG, D. W.; WARD, T. J.; ARMSTRONG, R. D.. Separation of drug stereoisomers by the formation of Beta-cyclodextrin inclusion complexes. *Science*, n. 232, p. 1132-1135, 1986.

ATANASOVA, N.; PETROVA, P.; IVANOVA, V.; YANKOV, D.; VASSILEVA, A.; TONKOVA, A. Isolation of Novel Alkaliphilic *Bacillus* Strains for Cyclodextrin Glucanotransferase Production. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 149, p. 155-167, 2008.

ATANASOVA, N.; KITAYSKA, T.; YANKOV, D.; SAFARIKOVA, M.; TONKOVA, A. Cyclodextrin glucanotransferase production by cell biocatalysts of alkaliphilic bacilli. *Biochemical Engineering Journal*, v. 46, p. 278-285, 2009.

ATANASOVA, N.; KITAYSKA, T.; BOJADJIEVA, I.; YANKOV, D.; TONKOVA, A. A novel cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF: Purification and properties. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 116-122, 2011.

BARÃO, C. E ; PAIVA-MARTINS, F. ; ZANIN, G. M. ; MORAES, F. F. Determination of the inclusion complex constant between oleuropein and cyclodextrins by complexation theory. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry (Print)*, v. 78, p. 465-470, 2013.

BEKERS, O.; UIJTENDAAL, E. V.; BEIJNEN, J. H.; BULT, A.; UNDERBERG, W. J. M. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 17, p. 1503-1549, 1991.

BENDER, H. Production, characterization and application of CDs. *Advances Biotechnological Process*, v. 6, p. 31-71, 1986.

BERGAMASCO, R. C.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Sulfluramid volatility reduction by beta-cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1139, 2005.

BERGAMASCO, R. C. ; ZANIN, G. M. ; MORAES, F. F. . Grafting of cyclodextrins onto filter paper. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry (Online)*, v. 57, p. 75-78, 2007.

BERNA, P. - Etude de la purification et de l'interaction de la cyclodextrine glycosyl transferase avec un ligand biospecifique et un ligand pseudobiospecifique. Tese Doutorado, Université de Technologie de Compiègne, França, 1990.

BLANCO, K. LIMA, C. J. B. DE; MONTI, R.; MARTINS, Jr. J.; BERNARDI, N. S.; CONTIERO, J. *Bacillus lehensis*—an alkali-tolerant bacterium isolated from cassava starch wastewater: optimization of parameters for cyclodextrin glycosyltransferase production. *Ann Microbiol*, p. 1-9. 2011.

BONECHAR. Bonechar do Brasil Carvão Ativado. Disponível em: <<http://www.bonechar.com.br/>>. Acesso em: ago. 2011.

BONILHA, P. R. M.; MENOCCI, V.; GOULART1, A. J.; POLIZELI1, M. de L. T. de M.; MONTI, R. Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus licheniformis*: optimization of production and its properties. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 317-323, 2006.

BORZANI, W.; LIMA, U. de A.; SCMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, v. 1, p. 197-216, 2001.

BRODELIUS, P.; VANDAMME, E. J. Immobilized cell systems. In: REHM, H. J., REED, G. *Biotechnology – A Comprehensive Treatise* Weinheim: Verlag Chemie, p. 405-464, 1987.

BURHAN, N.; SAPUNDZHIEV, T.; BESCHKOV, V. Mathematical modelling of cyclodextrin-glucanotransferase production by batch cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 24, p. 73-77, 2005.

BURHAN, N.; SAPUNDZHIEV, T.; BESCHKOV, V. Mathematical modelling of cyclodextrin-glucano-transferase production by immobilised cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783 at batch cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 35, p. 114-11, 2007.

CABELLO, P. E.; SCOGNAMIGLIO, F. P.; TERÁN, F. J. C. Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio de leito fluidizado. *Engenharia Ambiental, Espírito Santo do Pinhal*, v. 6, n. 1, p.321-338, 2009.

CALSAVARA, L. P. V. Produção de ciclodextrinas na presença de etanol e formação de complexos de inclusão CD/enrofloxacina. Tese de Doutorado - UEM, Maringá, 2010.

CANTARELLI, P. R.; PALMA, E. R.; CARUSO, J. G. B. Composition and amino acid profiles of tomato seeds from canning waste s. *Acta Alimentaria*, Budapeste, v.18, n. 1, p.13-18. 1989.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. da. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. *Revista Analytica*, v. 23, p.60-70, 2006.

CARVALHO, R. V. DE.; CORRÊA, T. L. R.; SILVA, J. C. M. DA; VIANA, A. P.; MARTINS, M. L. L. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, n. 2, p.380-386. 2008.

CHEN, S-B.; ZHU, Y-G.; MA, Y-B.; MCKAY, G. Effect of bone char application on Pb bioavailability in a Pb-contaminated soil. *Environmental Pollution*, v. 139, p. 433-439, 2006.

CHOY, K. K.H.; KO, D. C. K.; CHEUNG, C. W.; PORTER, J. F.; MCKAY, G. Film and intraparticle mass transfer during the adsorption of metal ions onto bone char. *Journal Of Colloid And Interface Science*, v. 71, p. 284-295, 2004.

CHOY, K. K. H.; MCKAY, G. Sorption of metal ions from aqueous solution using bone char. *Environment International*, v. 31, p. 845-854, 2005.

CODAS, B. V. B; SCHMIDELL, W.; ALÉM SOBRINHO, P. Avaliação da Transferência de Oxigênio em um biorreator aerado submerso com enchimento. In: Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 28, Cancun, México. 2002.

CORCORAN, E. The production and use of immobilized living microbial cells. In: WISEMAN, A. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. England: Ellis Horwood. v.10, p.12-50, 1985.

CORREIA, G. T. Efeito da Concentração do Meio Suporte e Relação entre Áreas no Desempenho de Reatores Aeróbios de Leito Fluidizado com Circulação Interna no Tratamento de Esgoto Doméstico. Dissertação de Mestrado - UNESP, Ilha Solteira, 2010.

COSTA, G. DE L.; PAZZETTO, R.; BROL, F.; MATIOLI, G. Metodologia de seleção de cepas para produção da ciclodextrina glicosiltransferase e para purificação da enzima. *Acta Sci. Health Sci.*, Maringá, v. 29, n. 1, p.45-50, 2007.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. da. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 28, n. 2, p.143-160. 2007.

COVIZZI, L. G. Seleção de um suporte sintético para imobilizar células do *Botryosphaeria rhodina* e comparação da produção de lacyase por células livres e imobilizadas. Dissertação de Mestrado - UNESP, São José Do Rio Preto, 2007.

CUCOLO, G. R.; ALVES –PRADO, H. F.; GOMES, E.; SILVA, R. da. Otimização da Produção de CGTase de *Bacillus* sp. subgrupo alcalophilus E16 em polvilho doce em fermentação submersa. *Brazilian Journal Food Technology*, v. 9, n. 3, p. 201-208, 2006.

CULLITY, B. D. Elements X-ray of diffraction. ADDISON-WESLEY PUBLISHING COMPANY, Inc., cap. 1. 1956.

DIXON, M.; WEBB, E.. Enzymes. London: Longman Group Limited, cap. 2, 3^o ed. 1979.

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

DUCHÊNE, D. Cyclodextrin and their industrial uses. *Edition de Santé*, Paris, 300 p., 1987.

ENDO, T.; UEDA, H. Large ring cyclodextrins - Recent progress. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 29, p. 27-38, 2004.

FREIRE, F. B.; PIRES, E. C. Avaliação de material suporte para biomassa em reatores de leito fluidizado: aderência e hidrodinâmica. *Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra, Seropédica*, v. 23, n. 1-2, p.34-43. 2004.

FREIRE, F. B.; PIRES, E. C.; FREIRE, J. T. Influência da imobilização de biomassa e do tamanho da partícula na fluidodinâmica de um reator anaeróbio de leito fluidizado. *Acta Sci. Technol.*, Maringá, v. 30, n. 1, p.73-81, 2008.

FREITAS, T. L. de; MONTI, R.; CONTIERO, J. Production of CGTase by a *Bacillus* Alkalophilic CGII Strain Isolated from Wastewater of a manioc flour Industry. *Brazilian Journal Of Microbiology*, v. 35, p. 255-260, 2004.

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

GAWANDE B. N.; SINGH R. K.; CHAUHAN, A. K.; GOEL, A.; PATKAR, A. Y. Optimization of cyclomalto-dextrin glucanotransferase production from *Bacillus firmus*. *Enzyme Microb Technol*, v. 22, p. 288-291, 1998.

GAWANDE, B. N., PATKAR, A. Y. Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* as-22. *Enzyme Microb Technol.*, v. 28, p. 735–743. 2001.

GEBARA, D. Desempenho de um Reator Aeróbio de Leito Fluidizado no Tratamento de Esgoto Sanitário. Tese de Doutorado - USP, São Paulo, 2006.

GEETHA, R.; MORE, S. S. Isolation and Characterization of Cyclodextrin Glucanotransferase from Soil Bacterium. *Research Journal Of Biological Sciences*, v. 5, n. 10, p. 699-707, 2010.

GONÇALVES, C. R. Remoção de manganês e recuperação de urânio presentes em águas ácidas de mina. Dissertação de Mestrado - Centro De Desenvolvimento Da Tecnologia Nuclear, Comissão Nacional De Energia Nuclear, Belo Horizonte, 2006.

GUEDES, T. S.; MANSUR, M. B; ROCHA, S. D. F. A Perspective of bone char use in the treatment of industrial liquid effluents containing heavy metals. *XXII ENTMME / VII MSHMT*. Ouro Preto-MG. 2007.

GUEDES, T. S.; MAGALHÃES, F. S.; ROCHA, S. D. F. Potencial de adsorção de metais pesados por carvão de ossos bovinos. *XXI ENTMME*, Natal-RN. 2005.

HAMOM, V. MORAES, F. F. Etude Preliminare a L'Immobilisation de L'Enzime CGTase WACKER. Relatório de Pesquisa, Laboratoire de Technologie Enzymatique, *Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France*, 234 f. 1990.

HASSAN, S. S. M.; AWWAD, N. S.; ABOTERIKA, A H. A.. Removal of mercury(II) from wastewater using camel bone charcoal. *Journal of Hazardous Materials*, v. 154, p. 992-997, 2008.

HIGUTI, I. H. Isolation of Alkalophilic CGTase-Producing Bacteria and Characterization of Cyclodextrin-Glycosyltransferase. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 46, n. 2, p. 183-186, 2003.

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

HORIKOSHI, K. Enzymology and molecular genetics of CD-forming enzymes. In: HUBER, O. e SZEJTLI, J. (eds.). Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, p. 7-17, 1988.

HORIKOSHI, K. Alkaliphiles. *Proc. Jpn. Acad.*, v. 80, p. 166-178, 2004.

IBRAHIM, H. M.; YUSOFF, W. M. W.; HAMID, A. A.; OMAR, O. Enhancement of Cyclodextrin Glucanotransferase Production by *Bacillus* G1 using Different Fermentation Modes. *Biotechnology*, New York, v. 9, n. 4, p. 506-512, 2010.

JAMUNA R.; SASWATHI, N.; SHEELA, R.; RAMAKRISHNA, S. V. Synthesis of cyclodextrin glycosyltransferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 43, p. 163–76, 1993.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. *Química Nova*, v. 31, n. 1, p.134-143, 2008.

KELLY, R. M.; DIJKHUIZEN, L.; LEEMHUIS, H. The evolution of cyclodextrin glucanotransferase product specificity. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 84, p.119–133, 2009.

KITAYSKA, T.; PETROVA, P.; IVANOVA, V.; TONKOVA, A. I. Purification and Properties of a New Thermostable Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, p. 1-11, 2011.

KOCHER, G. S.; MISHRA, S. Immobilization of *Bacillus circulans* MTCC 7906 for enhanced production of alkaline protease under batch and packed bed fermentation conditions. *The Internet Journal Of Microbiology*, v. 7, n. 2, p. 1-11, 2009.

KUNAMNENI, A.; PRABHAKAR, T.; JYOTHI, B.; ELLAIAH, P. Investigation of continuous cyclodextrin glucanotransferase production by the alginate-immobilized cells of alkalophilic *Bacillus* sp. in an airlift reactor. *Enzyme And Microbial Technology*, v. 40, p. 1538-1542, 2007.

KUNII, D.; LEVENSPIEL, O. Fluidization Engineering. New York, John Wiley & Sons, Inc. 1969.

KUO, C. C.; LIN, C. A.; CHEN, J. Y.; LIN, M. T.; DUAN, K. J. Production of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* sp. by pH-stat fed-batch fermentation. **Biotechnol Lett**, v. 31, p.1723–1727. 2009.

LAPA, K. R. Avaliação de Desempenho do Reator Anaeróbio em Batelada Sequencial (ASBR), contendo Biomassa Imobilizada em pedra pome, para o Tratamento de Esgoto Sanitário. Dissertação de Mestrado - UFSCAR, São Carlos, 2003.

LEEMHUIS, H.; KELLY, R. M.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 85, p. 823-835, 2010.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. São Paulo: Sarvier. 839 p.1995.

LETSIDIDI, R.; SUN, T.; MU, W.; KESSY, N. H.; DJAKPO, O.; JIANG, B. Production of a Thermoactive Beta-cyclodextrin Glycosyltransferase with a High Starch Hydrolytic Activity from an Alkalitolerant *Bacillus licheniformis* Sk 13.002 Strain. *Asian Journal Of Biotechnology*, v. 3, n. 3, p. 214-225, 2011.

LEYVA-RAMOS, R.; RIVERA-UTRILLA, J.; MEDELLIN-CASTILLO, N. A.; SANCHEZ-POLO, M. Kinetic modeling of fluoride adsorption from aqueous solution onto bone char. *Chemical Engineering Journal*, v. 158, p. 458-467, 2010.

LIU, Y. K.; SEKI, M.; TANAKA, H.; FURUSAKI, S. Characteristics of Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge as a carrier for plant cell immobilization. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 85, n. 4, p. 416-421, 1998.

LO, P. K.; TAN, C. Y.; HASSAN, O.; AHMAD, A.; MAHADI, N. M.; ILLIAS, R. M. Improvement of Excretory Overexpression for *Bacillus* sp. G1 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) in recombinant *Escherichia coli* through medium optimization. *Biotechnology*, v. 8, n. 2, p.184-193, 2009.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. 1951.

LURTWITAYAPONT, S.; SRISATIT, T. Comparison of Lead Removal by Various Types of Swine Bone Adsorbents. *The International Journal Published By The Thai Society Of Higher Education Institutes On Environment*, v. 3, n. 1, p. 32-38, 2010.

McCABE, W. L., SMITH, J. C., HARRIOT, P. Unit Operations of Chemical Engineering. McGraw Hill International Ed., 6th ed., 2001.

MARQUES, M. B. A. Produção da enzima ciclodextrina-glicosil-transferase em diferentes meios de cultivo utilizando o *Bacillus firmus* alcalofílico – cepa 37. Dissertação de mestrado - UEM, Maringá, 2004.

MARTINS, R. F.; DELGADO, O.; HATTI-KAUL, R. Sequence analysis of cyclodextrin glycosyltransferase from the alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. *Biotechnology Letters*, v. 25, p. 1555-1562, 2003a.

MARTINS, R. F.; PLIEVA, F. M.; SANTOS, A.; HATTI-KAUL, R. Integrated immobilized cell reactor-adsorption system for β -cyclodextrin production: a model study using PVA-cryogel entrapped *Bacillus agaradhaerens* cells. *Biotechnology Letters*, v. 25, p. 1537-1543, 2003b.

MARTINS Jr., W. N. Perdas de Carga e Velocidades Induzidas em Reatores Aeróbios de Leito Fluidizado com Circulação. Dissertação de Mestrado - UNESP, Ilha Solteira, 2005.

MATIOLI, G. Seleção de microrganismo e caracterização de sua enzima ciclodextrina glicosiltransferase. Tese de Doutorado - UFPR, Curitiba, 1997.

MATIOLI, G.; MORIWAKI, C.; MAZZONI, R. B.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. de. Estudos de parâmetros que influenciam na produção da enzima CGTase de *Bacillus firmus*, cepa nº 37. *Acta Scientiarum*, v. 22, n. 2, p.311-316, 2000.

MATIOLI, G. Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais. Co-autores: ZANIN, Gisella M.; MORAES, Flávio F. De. Maringá: Eduem, 124 p. 2000.

MATIOLI, G.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. de. Influence of substrate and product concentrations on the production of cyclodextrins by CGTase of *Bacillus firmus*, strain nº 37. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, v. 98-100, p. 947-961. 2002.

MAZONI, R. B.; MARIOWAKI C.; MORAES, F. F. DE; ZANIN, G. M.; MATIOLI, G. Propriedades da ciclodextrina glicosiltransferase produzida por *Bacillus firmus* alcalofílico. *Arq. Ciência Saúde Unipar*, Maringá, v. 4, n.3, p.235-242, 2000.

MAZZER, C.; FERREIRA, L. R.; RODELLA, J. R. T.; MORIWAKI, C.; MATIOLI, G. Cyclodextrin production by *Bacillus firmus* strain 37 immobilized on inorganic matrices and alginate gel. *Biochemical Engineering Journal*, v. 41, p. 79-86, 2008.

MENOCCI, V.; GOULART, A. J.; ADALBERTO, P. R.; TAVANO, O. L.; MARQUES, D. P.; CONTIERO, J.; MONTI, R. Cyclodextrin glycosyltransferase production by new *Bacillus* sp. strains isolated from Brazilian soil. *Brazilian Journal Of Microbiology*, v. 39, p. 682-688, 2008.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIQUELETO, A. P. Comportamento de reator anaeróbio operando em batelada sequencial, contendo biomassa imobilizada e submetido a aumento progressivo da concentração de substrato de fácil degradação. Dissertação de Mestrado - USP, São Carlos, 2003.

MORENO, J. C.; GÓMEZ, R.; GIRALDO, L. Removal of Mn, Fe, Ni and Cu Ions from Wastewater Using Cow Bone Charcoal. *Materials*, v. 3, p. 452-466, 2010.

MORIWAKI, C.; PELISSARI, F. M.; GONÇALVES, R. A. C.; GONÇALVES, J. E.; MATIOLI, G. Immobilization of *Bacillus firmus* strain 37 in inorganic matrix for cyclodextrin production. *Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 49, p. 1-7, 2007a.

MORIWAKI, C.; COSTA, G. L.; PAZZETTO, R.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.de; PORTILHO, M.; MATIOLI, G. Production and characterization of a new cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* isolated from Brazilian soil. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1384-1390, 2007b.

MORIWAKI, C.; FERREIRA, L. R.; RODELLA, L. R. T.; MATIOLI, G. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus sphaericus* strain 41: Production, characterization and catalytic properties. *Biochemical Engineering Journal*, v. 48, p. 124-131, 2009.

NAKAGAWA, T.; UENO, K.; KASHIWA, M.; WATANABE, J. The stereoselective synthesis of cyclomaltopentaose. A novel cyclodextrin homologue with D.P. five. *Tetrahedron letters*, v. 35, n. 12, p. 1921-1924, 1994.

NAKAMURA, N.; HORIKOSHI, K.. Characterization and Some Cultural Conditions of a Cyclodextrin Glycosyltransferase-producing Alkalophilic *Bacillus* sp. *Agricultural Biological Chemistry*, v. 40, p. 753-757, 1976.

NAKAMURA, A.; HAGA, K. e YAMANE, K. Four aromatic residues in the 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.

NICOLELLA, C.; VAN LOODRESCHT, M. C. C.; HEIJNEN, J. J. Identification of mass transfer parameters in three-phase biofilm reactors. *Chemical Engineering Science*, New York, v.54, n. 13-14, p.3143-3152, 1999.

NGANDWE, N. Toxicity of animal bone charcoal from pig and cattle to aquatic bioassays: *Vibrio fischeri*, *Daphnia Magna* and *Selenastrum capricornutum*. Tese de Doutorado - Universidade de Leipzig/Alemanha, Leipzig, 2007.

OHDAN, K.; KURIKI, T.; TAKATA, H.; KANEKO, H.; OKADA, S. Introduction of Raw Starch-Binding Domains into *Bacillus subtilis* α -amylase by Fusion with the Starch-Binding Domain of *Bacillus Cyclomalto*dextrin Glucanotransferase. *Appl Environ Microbiol*, v. 66, p. 3058-3064, 2000.

OKA, S. N. Fluidized Bed Combustion. Marcel Dekker, Inc., New York. 2004.

PAN, X.; WANG, J.; ZHANG, D. Sorption of cobalt to bone char: Kinetics, competitive sorption and mechanism. *Desalination*, v. 249, p. 609-614, 2009.

PAZZETTO, R.; DELANI, T. C. O.; FENELON, V. C.; MATIOLI, G. Cyclodextrin production by *Bacillus firmus* strain 37 cells immobilized on loofa sponge. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 46-51, 2011.

PINTO, F. S. T. Produção de Ciclodextrina Glicosiltransferase pela Bactéria Alcalófila *Bacillus circulans* ATCC 21783: Cultivo em Batelada, Batelada Alimentada e Estado Semi-Sólido. Dissertação de Mestrado - UFRGS, Porto Alegre, 2007.

PINTO, F. S. T.; FLÔRES, S. H.; AYUB, M. A. Z.; HERTZ, P. F. 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.; FLÔRES, S. H.; SCHNEIDER, C. E.; AYUB, M. A. Z.; HERTZ, P. F. The Influence of Oxygen Volumetric Mass Transfer Rates on Cyclodextrin Glycosyltransferase Production by Alkaliphilic *Bacillus circulans* in Batch and Fed-Batch Cultivations. *Food Bioprocess Technology*, v. 4, p. 559-565, 2011.

POSTMA, J.; NIJHUIS, E.h.; SOMEUS, E.. Selection of phosphorus solubilizing bacteria with biocontrol potential for growth in phosphorus rich animal bone charcoal. *Applied Soil Ecology*, v. 46, p. 464-469, 2010.

QI, Q.; MOKHTAR, M. N.; ZIMMERMANN, W. Effect of ethanol on the synthesis of large-ring cyclodextrins by cyclodextrin glucanotransferases. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 57, p. 95-99, 2007.

RAMAKRISHNA, S. V.; PRAKASHAM, R. S. Microbial fermentations with immobilized cells. *Current Science*. v.77, p.87-100, 1999.

RAO, S. M.; REDDY, B. V. V.; LAKSHMIKANTH, S.; AMBIKA, N. S. Reuse of fluoride contaminated bone char sludge in concrete. *Journal of Hazardous Materials*, v. 166, p. 751-756, 2009.

RAUF, Z. A.; ILIAS, R. Md.; MAHADI, N. M.; HASSAN, O. Experimental design to optimization of beta cyclodextrin production from ungelatinized sago starch. *Eur Food Res Technol.*, v. 226, p. 1421–1427, 2008.

REIS, G. G. Influência da carga orgânica no desempenho de reatores de leito móvel com biofilme (MBBR). 153f. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química - COPPE, Universidade Federal do Rio De Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2007.

RIBA, J. P.; COUDERC, J. P. Expansion de Couches Fluidisées par des Liquides. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v.55, p. 118-121, 1977.

RICHARDSON, J. F.; ZAKI, W. N. Sedimentation and fluidization: part I. *Transactions Institution Chemical Engineers*, v. 32, p. 35-53, 1954.

ROSA, A. A. Pré-cloração associada à adsorção em carvão ativado em pó e flotação por ar dissolvido na remoção de microcistina presente em três diferentes concentrações em águas provenientes de reservatório eutrofizado. Dissertação de Mestrado - USP, São Carlos, 2008.

ROSSO, A. M.; FERRAROTTI, S. A.; KRYMKIEWICZ, N.; NUDEL, B. C. Optimisation of batch culture conditions for cyclodextrin glucanotransferase production from *Bacillus circulans* DF 9R. *Microbial Cell Factories*, v. 1, p. 1-9, 2002.

SADER, L. T. Avaliação de Partículas Poliméricas como Material Suporte em Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado no Tratamento de Fenol. 158 f. Dissertação de Mestrado - UFSCAR, São Carlos, 2005.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, n. 1, p. 1-16, 2001.

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

STEFANOVA, M. E.; TONKOVA, A. I.; DOBREVA, E. P.; SPASOVA, D. I. Agar Gel Immobilization of *Bacillus brevis* Cells for Production of qhermostable o alfa-Amylase. *Folia Microbiol*, v. 43, p. 42-46, 1998.

SZEJTLI, J. Industrial applications of cyclodextrins. London: Academic Press, v. 3, p. 331-339, 1984.

SZEJTLI, J. Cyclodextrins and the molecular encapsulation. *Chimicaoggi*. v. 3, p.17-21, 1987.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin Technology, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 1988.

TARDIOLI, P. W. Produção de ciclodextrinas em reator de leito fluidizado com a enzima ciclodextrina glicosiltransferase imobilizada. 169 f. Dissertação de Mestrado - UEM, Maringá, 1998.

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

TONKOVA, A. Bacterial cyclodextrin *glucanotransferase*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, p. 678-686, 1998.

ULLAH, H.; SHAH, A. A.; HASAN, F.; HAMEED, A. Biodegradation of trinitrotoluene by immobilized *Bacillus* sp. YRE1. *Pak. J. Bot.*, v. 42, p. 3357-3367, 2010.

VALLE, E. M. M. Del. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1033-1046, 2004.

VASSILEVA, A.; BURHAN, N.; BESCHKOV, V.; SPASOVA, D.; RADOEVSKA, S.; IVANOVA, V.; TONKOVA, A. Cyclodextrin glucanotransferase production by free and agar gel immobilized cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783. *Process Biochemistry*, v. 38, p.1585-1591, 2003.

VASSILEVA, A.; BESCHKOV, V.; IVANOVA, V.; TONKOVA, A. Continuous cyclodextrin glucanotransferase production by free and immobilized cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783 in bioreactors. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3290-3295, 2005.

VENTURINI, C. DE G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Química Nova*, v. 31, n. 2, p.360-368, 2008.

VILLETE, J.; BOUQUELET, S.; LELEU, J. B.; SI-CARD, P. J. Isolation and mechanism of action of the cycloglucosyl transferase from *Bacillus circulans*. In: DUCHÊNE, D. *Minutes of the 5th International Symposium on Cyclodextrins*. Paris: Editions Santé, p. 32-38, 1990.

XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; LOOSDRECHT, M. C. M. van. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia*, São Paulo, v.76, n.1, p. 2-13, 2003.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances*, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.

WANG, F.; DU, G. C.; LI, Y.; CHEN, J. Regulation of CCR in the Gama-CGTase production from *Bacillus macorouus* by the specific cell growth rate control. *Enzyme And Microbial Technology*, v. 39, p. 1279-1285, 2006.

WARREN, G. P.; ROBINSON, J. S.; SOMEUS, E.. Dissolution of phosphorus from animal bone char in 12 soils. *Nutr Cycl Agroecosyst*, New York, v. 84, p. 167-178, 2009.

WEBB, C.; ATKINSON, B. The role of Chemical engineering in biotechnology. *The Chemical Engineering Journal*, v. 50, p. B9-B16,1992.

WILSON, J. A.; PULFORD, I. D.; THOMAS, S. Sorption of Cu and Zn by bone charcoal. *Environmental Geochemistry And Health*, v. 25, p. 51-56, 2003.

XIAORAN, S.; ZHONGJIAN, S. Removal of Di-n-butyl Phthalate Using *Immobilized Microbial Cells*. *Chin. J. Chem. Eng.*, v. 15, n. 2, p. 167-171, 2007.

ZANIN, G. M. Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglicosidase Imobilizada, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 499 p. 1989.

8. APÊNDICES

8.1. CURVAS DE CALIBRAÇÃO

8.1.1. Curvas de Calibração de β -CD

Tabela A. 1 - Absorvâncias a 550 nm para diferentes concentrações de β -CD.

Volume de água destilada com 20 % de tampão Tris-HCl	β -CD (1mM) mL	Conc. Final de β -CD (mM)	Solução de trabalho de FENF 0,06 M (mL)	A1	A2	Abs. Média (550 nm)
0,500	0	0	2,5	1,482	1,481	1,4815
0,450	0,050	0,1	2,5	1,321	1,323	1,322
0,400	0,100	0,2	2,5	1,154	1,165	1,1595
0,350	0,150	0,3	2,5	1,044	1,017	1,0305
0,300	0,200	0,4	2,5	0,918	0,902	0,91
0,250	0,250	0,5	2,5	0,770	0,776	0,773
0,200	0,300	0,6	2,5	0,704	0,709	0,7065
0,150	0,350	0,7	2,5	0,634	0,639	0,6365
0,100	0,400	0,8	2,5	0,584	0,601	0,5925
0,050	0,450	0,9	2,5	0,544	0,550	0,547
0	0,500	1,0	2,5	0,514	0,503	0,5085

Em que $ABS_0 = 1,76$ (água + FENF) e $k = 18655,7 \text{ M}^{-1}$

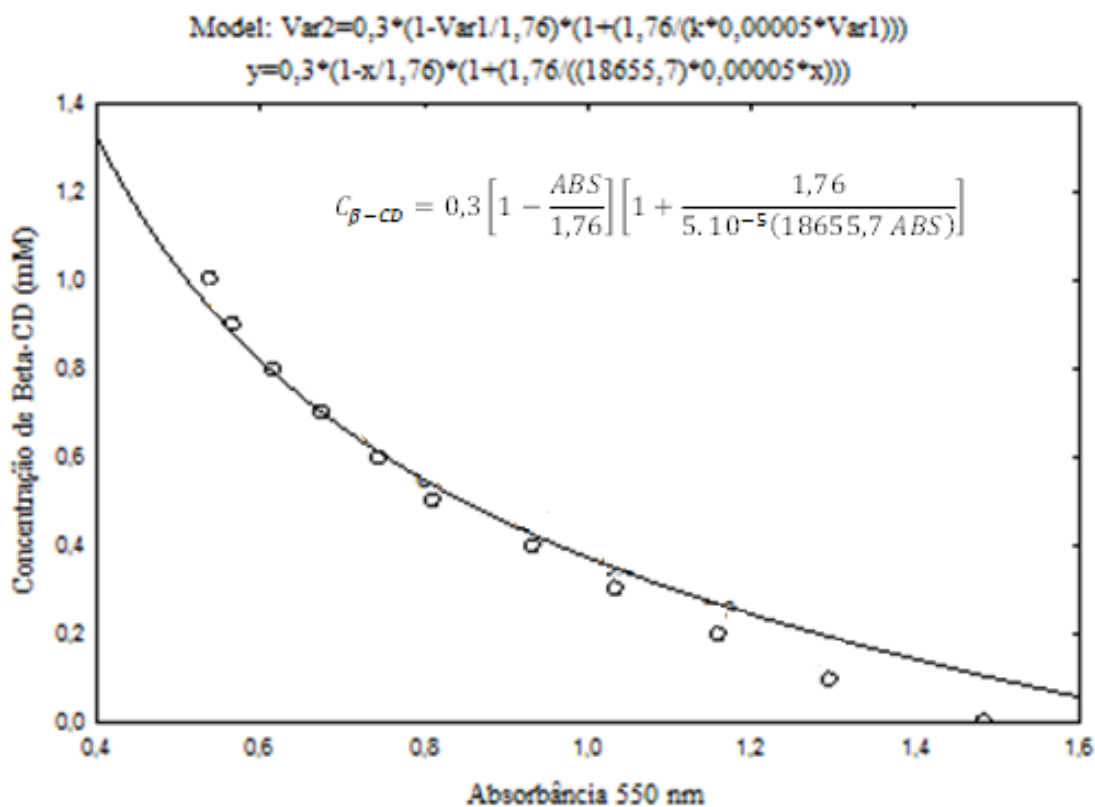


Figura A. 1 - Ajuste dos dados de absorvância a 550 nm em função da concentração de β -CD em mM.

8.1.2. Curvas de Calibração de Proteína Solúvel

Tabela A. 2 - Absorvâncias a 625 nm para diferentes concentrações de proteína albumina.

Absorvância (625 nm)	Concentração de proteína (mg/mL)
0	0
0,0470	0,2
0,0725 ± 0,009	0,4
0,1320 ± 0,001	0,8
0,1565 ± 0,004	1
0,1765 ± 0,009	1,2
0,1985 ± 0,003	1,4
0,2140	1,6

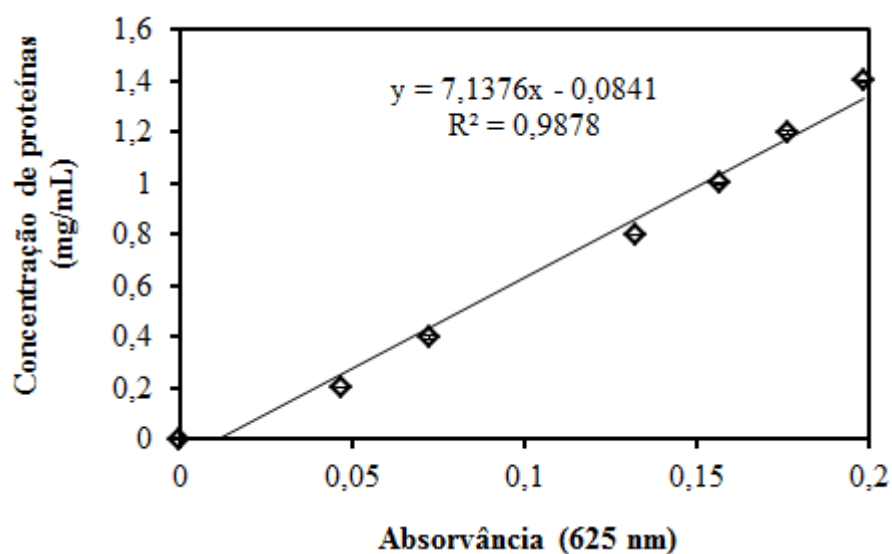


Figura A. 2 - Reta ajustada para a determinação da curva de calibração de proteína.

8.1.3. Curvas de Calibração de Açúcares Redutores

Tabela A. 3 - Absorvâncias a 600 nm para diferentes concentrações da solução de glicose e frutose.

Tubo	Vol.Sol. Glicose+Frutose (mL)	Vol. Água (mL)	Conc. Glicose+Frutose (g/L)	Abs1 (600 nm)	Abs2 (600 nm)	Abs. Média (600 nm)
1	0	4	0	0	0	0
2	0,2	3,8	0,05	0,002	0,002	0,002 ± 0,01
3	0,4	3,6	0,1	0,009	0,031	0,02 ± 0,04
4	0,6	3,4	0,15	0,0031	0,06	0,031 ± 0,01
5	0,8	3,2	0,2	0,057	0,076	0,066 ± 0,01
6	1	3	0,25	0,081	0,103	0,092 ± 0,01
7	1,2	2,8	0,3	0,112	0,133	0,122 ± 0,01
8	1,4	2,6	0,35	0,137	0,159	0,148 ± 0,01
9	1,6	2,4	0,4	0,165	0,18	0,172 ± 0,01
10	1,8	2,2	0,45	0,185	0,208	0,196 ± 0,01
11	2	2	0,5	0,212	0,235	0,223 ± 0,01
12	2,2	1,8	0,55	0,233	0,256	0,244 ± 0,01
13	2,4	1,6	0,6	0,257	0,264	0,260 ± 0,004
14	2,6	1,4	0,65	0,276	0,309	0,292 ± 0,02
15	2,8	1,2	0,7	0,302	0,339	0,320 ± 0,02
16	3	1	0,75	0,33	0,363	0,346 ± 0,02
17	3,2	0,8	0,8	0,36	0,395	0,377 ± 0,02
18	3,4	0,6	0,85	0,384	0,415	0,399 ± 0,02
19	3,6	0,4	0,9	0,395	0,437	0,416 ± 0,02
20	3,8	0,2	0,95	0,42	0,448	0,434 ± 0,01
21	4	0	1	0,442	0,464	0,453 ± 0,01

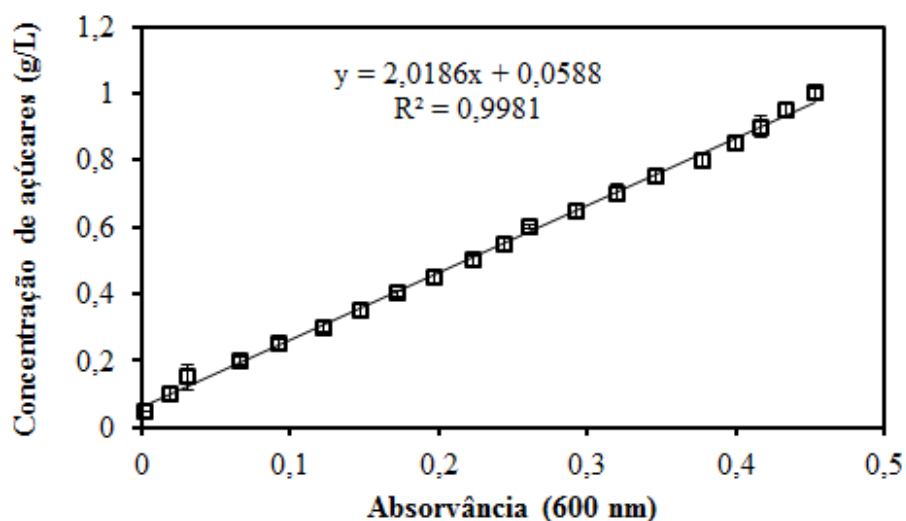


Figura A. 3 - Reta ajustada para a determinação da curva de calibração de glicose e frutose.

8.1.4. Curvas de Calibração de Concentração Celular

Tabela A. 4 - Dados da Curva de Calibração de Concentração Celular

Alíquotas	Massa <u>antes</u> de filtrar	Massa <u>depois</u> de filtrar	Diferença	Conc. g/L	Abs. 660 nm
1 % (0,2 ^a +19,8H ₂ O)	32,9979	32,9985	0,0006	0,03	0,013
2,5 % (0,5+19,5H ₂ O)	33,4245	33,4261	0,0016	0,08	0,186
5 % (1 ^a +19H ₂ O)	14,0887	14,0913	0,0026	0,13	0,36 ± 0,001
10 % (2 ^a +18H ₂ O)	14,1517	14,1562	0,0045	0,225	0,699 ± 0,0007
15 % (3 ^a +17H ₂ O)	14,7131	14,7202	0,0071	0,355	0,995 ± 0,03
20 % (4 ^a +16H ₂ O)	14,7681	14,7765	0,0084	0,42	1,239 ± 0,01
30 % (6 ^a +14H ₂ O)	14,6925	14,7041	0,0116	0,58	1,587 ± 0,001
Sem diluição (20ml)	14,7968	14,8365	0,0397	1,985	2,323

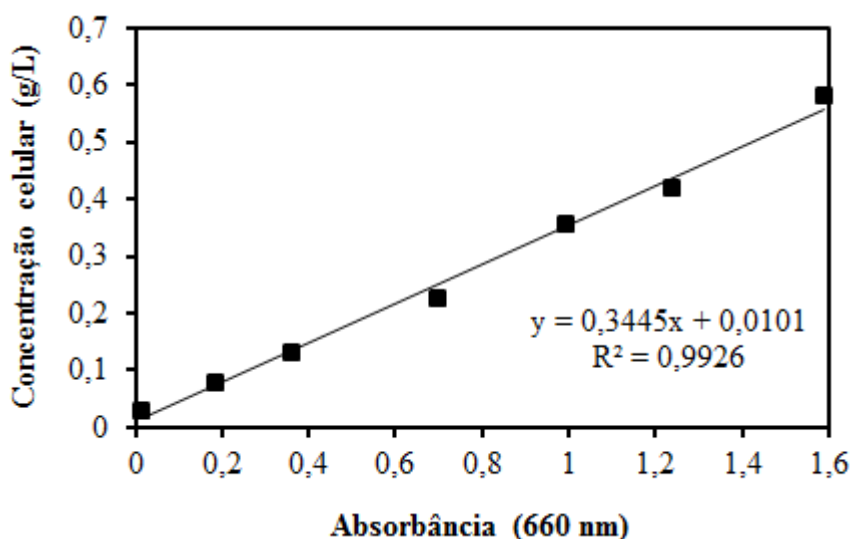


Figura A. 4 - Ajuste dos dados de absorvância a 660 nm em função da concentração de celular (g/L) de *Bacillus firmus* cepa 37.

8.2. CÁLCULO DA VELOCIDADE MÍNIMA DE FLUIDIZAÇÃO

$$d_i \text{ coluna} = 2,1 \text{ cm}$$

$$d_p = 0,79 \text{ mm} = 0,079 \text{ cm}$$

$$\rho_{\text{meio}} = 1,148 \text{ g/cm}^3$$

$$\varepsilon_p = 0,6172$$

$$\mu_{\text{meio}} (37 \text{ }^\circ\text{C}) = 1,2548 \times 10^{-2} \text{ g/(cm.s)} = 1,2548 \text{ cP}$$

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

$$\rho_c \text{ (densidade cristalina)} = 2,8536 \text{ g/cm}^3$$

$$\rho_{\text{ap}} = \{[(1 - \varepsilon_p) (\rho_c)] + [\varepsilon_p (\rho_{\text{meio}})]\} = \{[(1 - 0,6172) (2,8536)] + [0,6172 (1,148)]\} = 1,8006 \text{ g/cm}^3$$

8.2.1. Procedimento para o cálculo dos valores experimentais:

1 – Calcular propriedades físicas da partícula Equação 3.4: porosidade interna da partícula:

$$\varepsilon_p = V_{zp}/V_p$$

Equação 3.5: densidade do carvão seco:

$$\rho_p = (1 - \varepsilon_p)\rho_c = \frac{M_p}{V_z + V_c} = \frac{M_p}{V_p}$$

2 – Calcular a porosidade do leito (ε) a partir dos dados de altura de leito (H) em cada vazão: Equação 3.6: porosidade do leito expandido = f (altura de leito fluidizado, densidade seca da partícula).

$$\varepsilon = (V_t - V_s)/V_t = 1 - M_p/(\rho_p A_R H)$$

3 – Calcular a velocidade superficial em cada vazão:

$$u = \frac{\text{vazão}}{\text{área do reator}} = \frac{v}{\pi \frac{d_R^2}{4}}$$

d_R – diâmetro do reator.

4 – Calcular n e u_{tc} por ajuste da Equação 3.7, de Richardson e Zaki (1954) na forma linearizada aos dados de velocidade superficial do fluido (u) e porosidade do leito (ε): Equação 3.7: velocidade superficial do fluido = f (porosidade do leito expandido)

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

$$\ln u - \ln u_{tc} = n \ln \varepsilon$$

$$\ln u = n \ln \varepsilon + \ln u_{tc}$$

$$y = a.x + b$$

$$a = n$$

$$b = \ln u_{tc}$$

5 – Calcular u_t : Equação 3.8:

$$\text{Log}u_{tc} = \text{log}u_t - d_p/d_i$$

6 – Calcular a velocidade mínima de fluidização ajustando uma reta à região de leito fixo e outra reta à região de leito fluidizado. A intersecção entre as retas fornecerá a velocidade mínima de fluidização.

8.2.2. Procedimento para o cálculo dos valores teóricos:

1 – Calcular Re_p e u_t simultaneamente:

$$Re_p = \frac{\rho \cdot d_p \cdot u_t}{\mu}$$

$$u_t = g(\rho_{ap} - \rho)d_{carvão}^2 / (18\mu)$$

$$Re_p < 0,4$$

$$u_t = [4g^2(\rho_{ap} - \rho_L)^2 / (225\rho_L\mu)]^{1/3} d_{carvão}$$

$$0,4 < Re_p < 500$$

2 – Calcular u_{tc} :

$$\text{Log}u_{tc} = \text{log}u_t - d_p/d_i$$

3 – Calcular n :

$$n = 4,65 + 20d_p/d_i$$

$$Re_p < 0,2$$

$$n = (4,4 + 18d_p/d_i)Re_p^{-0,03}$$

$$0,2 < Re_p < 1,0$$

$$n = (4,45 + 18d_p/d_i)Re_p^{-0,1}$$

$$1,0 < Re_p < 200$$

4 – Com o valor da porosidade do leito na mínima condição de fluidização (ε_{mf}) observado no gráfico na intersecção das duas retas calcular a velocidade mínima de fluidização (u_{mf}):

$$\frac{u_{mf}}{u_{tc}} = \varepsilon_{mf}^n$$

O cálculo do tempo de residência foi feito pela relação do volume do reator e a vazão do fluido na entrada do reator, assim:

$$\tau = \frac{\text{volume de meio racional}}{\text{vazão do fluido na entrada do reator}} = \frac{140 \text{ mL}}{275 \text{ mL/min}} \cong 0,5 \text{ min.}$$

9. ANEXO

9.1. TEORIA DA COMPLEXAÇÃO (TARDIOLI, 1998)

A determinação da concentração de β -CD, utilizando a espectrofotometria pela fenolftaleína (FENF), baseia-se na formação de um complexo entre o corante e a molécula de CD a dosar, que causa redução da intensidade de cor da solução. O descoloramento da solução, devido à complexação das moléculas de α , β e γ -CD com a fenolftaleína é muito mais marcante para a β -CD, sendo, portanto este método preferencialmente utilizado para a determinação desta CD.

Como o complexo FENF-CD possui uma absorvância diferente da FENF livre, isso permite quantificar a CD presente na amostra. No entanto, a relação entre a absorvância e a concentração de β -CD, somente permanece linear para concentrações até 0,4 mM. Acima deste limite, faz-se necessário o uso da teoria da complexação, que fornece a relação não linear entre a absorvância e a concentração de β -CD, como descrito por HAMON e MORAES (1990).

Assumindo-se a formação de um complexo com apenas uma molécula hóspede (a FENF) e uma molécula hospedeira (a CD), e tratando-se a formação do complexo como uma reação reversível que está em equilíbrio na solução de dosagem, obtém-se:



Em que:

a = concentração total de fenolftaleína;

x = concentração total de CD;

w = concentração do complexo CD-fenolftaleína;

$(a - w)$ = concentração da fenolftaleína livre

$(x - w)$ = concentração da CD livre

Estando a reação de complexação 9.1 em equilíbrio, define-se a constante de equilíbrio termodinâmica (k) segundo a equação 9.2:

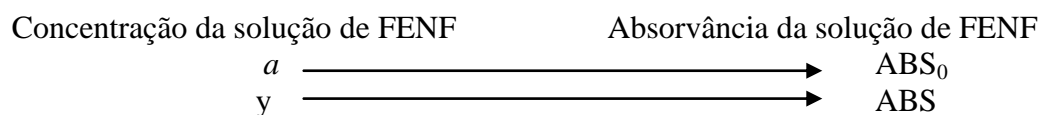
$$k = w / [(a-w) (x-w)] \quad (9.2)$$

Isolando-se w e x a partir da equação 9.2 resulta:

$$w = (1/2) \{ (a + x + 1/k) - [(a + x + 1/k)^2 - 4 a x]^{1/2} \} \quad (9.3)$$

$$x = w \{ 1 + 1 / [k (a - w)] \} \quad (9.4)$$

Chamando-se a concentração da fenolftaleína livre de y , isto é, $y = a-w$, e sabendo-se que complexo CD-FENF é incolor, isto é, sua absorvância é zero, conclui-se que a absorvância da solução de dosagem é diretamente proporcional à concentração de fenolftaleína livre:



logo:

$$y \cdot ABS_0 = a \cdot ABS, \text{ ou}$$

$$y = a (ABS / ABS_0) \quad (9.5)$$

Em que:

ABS = absorvância da solução de dosagem na presença de CD (FENF+amostra)

ABS_0 = absorvância da solução de dosagem na ausência de CD (FENF+H₂O)

Substituindo-se $w = (a - y)$ e $(a - w) = y$ nas equações 9.3 e 9.4 têm-se:

$$y = \frac{1}{2} \{ [a - (x + 1/k)] + [(a + x + 1/k)^2 - 4ax]^{1/2} \} \quad (9.6)$$

ou equivalentemente:

$$y = (1 / 2k) \{ - [1 + k(x - a)] + [(1 + K(x - a))^2 + 4ka]^{1/2} \} \quad (9.7)$$

e:

$$x = (a - y) [1 + 1 / (k y)] \quad (9.8)$$

Substituindo a equação 9.5 nas equações 9.6 e 9.8 obtém-se:

$$ABS = (ABS_0 / 2a) \{ [a - (x + 1/k)] + [(a + x + 1/k)^2 - 4ax]^{1/2} \} \quad (9.9)$$

$$x = a (1 - ABS/ABS_0) [1 + ABS_0 / (ka ABS)] \quad (9.10)$$

As equações 9.9 e 9.10 servem respectivamente para o cálculo da absorvância da solução de dosagem ou da concentração de CD na amostra, nas condições de dosagem.