

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO DE  $\beta$ -CICLODEXTRINA POR  
FERMENTAÇÃO E CICLIZAÇÃO SIMULTÂNEAS**

HERON OLIVEIRA DOS SANTOS LIMA

Maringá-PR  
Setembro, 1996 -

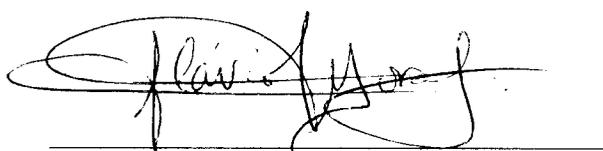
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão definitiva da Dissertação de Mestrado submetida por Heron Oliveira dos Santos Lima, à Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química na data de 09 de setembro de 1996.

COMISSÃO JULGADORA



Profª Gisella Maria Zanin, Dr. Eng.  
Orientadora



Prof. Flávio Faria de Moraes, Ph.D.  
Membro



Profª Maria Helena Andrade Santana, Dr. Eng.  
Membro

Aos meus pais, Waldecy e Margarida  
Aos meus irmãos, Rodrigo, Sandra e Érika  
Aos meus cunhados, Alexandre e Sílvio  
Às minhas sobrinhas e sobrinho, Gabriela,  
Jéssica, Maine e Alexandre Filho  
À minha orientadora e amiga Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Gisella  
À amiga, Rosa Maria Olher  
A todos aqueles que me são próximos  
**Com muito amor, carinho e gratidão.**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha mais profunda amizade e gratidão:

- À Prof<sup>a</sup> GISELLA MARIA ZANIN, não apenas pela orientação segura e objetiva, mas também pela amizade e incentivo, onde, ao longo desses anos de trabalho, principalmente, nos momentos mais difíceis, esteve sempre ao meu lado.
- Ao Prof. FLÁVIO FARIA DE MORAES, pelas orientações necessárias, encorajamento constante e, principalmente, pela disciplina no andamento deste trabalho.
- Aos Eng<sup>os</sup> LAURO MITSUAKI KAMBARA e LUIZA PEDRINA VILXENSKI CALSAVARA pelo apoio e valiosa colaboração no desenvolvimento de toda a parte experimental, e que dentro das possibilidades, sempre à disposição.
- Aos Técnicos e Auxiliares do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá, pelo apoio prestado durante a execução deste trabalho experimental.
- À Secretária do Mestrado MARILZA SADA KO KUABARA NERY, pela paciência e disposição, frente à burocracia necessária do dia-a-dia.
- Aos amigos MARCELO Capelasso, PLÍNIO Ribeiro, PEDRO Alexander e RICARDO Saravia, pelo convívio diário da república, e também pelo incentivo e apoio, nos momentos mais críticos.
- Aos meus COLEGAS da Pós-Graduação da Universidade Estadual de Maringá - UEM, pela simpatia, compreensão e proporcionarem o bom ambiente de trabalho.
- À Universidade Estadual de Maringá - UEM, pela concessão das instalações e dos equipamentos para o desenvolvimento deste trabalho.
- Aos meus Pais, WALDECY E MARGARIDA, que mesmo muito longe, não mediram esforços para tornar este sonho uma realidade, onde mais que o incentivo, prevaleceu o amor, o carinho, o exemplo e, principalmente, a herança da capacidade de luta para a conquista do meu objetivo.
- À Rosa Maria Olher, pelo carinho, compreensão, incentivo e apoio no decorrer deste trabalho e, sem dúvida, a companheira de todos os momentos.
- À amiga Graciette Martioli, pelo carinho e apoio no dia-a-dia do laboratório.
- À CAPES e ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudo e suporte financeiro para conclusão deste trabalho.
- A todos aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram para o êxito deste trabalho.

# PRODUÇÃO DE $\beta$ -CICLODEXTRINA POR FERMENTAÇÃO E CICLIZAÇÃO SIMULTÂNEAS

**AUTOR: HERON OLIVEIRA DOS SANTOS LIMA**

**ORIENTADOR: PROF<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> GISELLA MARIA ZANIN**

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 - 09; 87020-900 - Maringá - PR, Brazil. defendida em 09/Setembro/1996. 136 p.  
E-mail: gisellazanin@cybertelecom.com.br

## RESUMO

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos constituídos por um número variável de unidades de glicose (geralmente de 6 a 8), unidas por ligações  $\alpha$ -1,4. As mais comuns são:  $\alpha$ -CD (ciclohexamilose),  $\beta$ -CD (cicloheptamilose) e  $\gamma$ -CD (ciclooctamilose). São produzidas pela ação da enzima ciclodextrina glicosil transferase (CGTase) sobre o amido previamente liquefeito. O anel formado é muito hidrofílico externamente devido ao grande número de hidroxilas, mas relativamente hidrofóbico internamente devido às ligações glicosídicas e átomos de hidrogênio na face interior da cavidade. Esta estrutura favorece termodinamicamente, em soluções aquosas, a inclusão de moléculas apolares de tamanho adequado, no interior da cavidade da ciclodextrina. Para moléculas grandes e complexas é provavelmente a parte hidrofóbica que pode ser incluída no interior das CDs. Esta propriedade das CDs a tornam muito úteis na microencapsulação de produtos em nível molecular, conferindo estabilização química e física às substâncias complexas. Como consequência dessa propriedade as CDs tem um vasto campo de aplicação em várias indústrias, tal como: farmacêutica, alimentícia, cosméticos e agro-industriais.

A literatura sobre a produção de  $\beta$ -CD a partir de amido de batata e milho com adição de solventes (etanol entre outros) é relativamente rica, sendo que em todos os processos o rendimento da reação é afetado pela presença de malto-oligossacarídeos, que além de propiciarem a ocorrência das reações de transglicosilação intermolecular, atuam como inibidores da enzima CGTase. Entre estes açúcares destacam-se, principalmente, a glicose e a maltose.

Considerando o grande potencial de aplicação e a grande produção do amido de mandioca disponível no Brasil a um custo relativamente baixo, objetivou-se estudar neste trabalho a produção de  $\beta$ -CD por um processo de Fermentação e Ciclização Simultâneas (F.C.S.), oferecendo portanto, outra alternativa de uso da matéria-prima nacional. A idéia deste processo é eliminar a glicose e a maltose pela fermentação, pois estes açúcares inibem a produção de CD, e ao mesmo tempo produz-

se o etanol que aumenta o rendimento em CD. Este processo, na forma concebida neste trabalho, é uma idéia original ainda não explorada na literatura.

Soluções de amido liquefeito com diferentes Dextroses equivalentes (D.E.) foram produzidas pela hidrólise da fécula (amido de mandioca) com  $\alpha$ -amilase por períodos de até 45 min, para produzir uma D.E. igual a 22,20. As condições de reação de hidrólise foram: 95°C, pH 6,0, e solução de amido com concentração nominal a 10% p/v. O valor da D.E. foi determinado pelo método de Somogyi-Nelson.

A solução de amido com concentração nominal de 10% p/v, previamente liquefeito com  $\alpha$ -amilase, foi submetida à ação da enzima CGTase (CGTase WACKER) em meios reacionais contendo: (i) somente CGTase; (ii) CGTase + etanol (1 - 5% v/v), e (iii) CGTase + levedura *Saccharomyces cerevisiae* (12% p/v) + nutrientes (sulfato de amônio e superfosfato triplo - 0,15g cada). O último meio correspond ao processo F.C.S. As condições de reação foram: 38°C, pH 6,0 e D.E. de 2 a 25 e 0,50 mL de enzima CGTase para 150 mL de meio reacional. A solução estoque de enzima apresentava 0,9967 mg prot/ mL e uma atividade de 8,3  $\mu$ mol  $\beta$ -CD/ min L determinada a 38°C, pH 6,0 e solução de amido solúvel a 1% p/v. O método de determinação da  $\beta$ -CD foi espectrofotométrico baseado na descoloração da fenoltaleína pela complexação com  $\beta$ -CD. O etanol foi separado pela destilação e determinado por cromatografia a gás.

O rendimento em  $\beta$ -CD decresceu com o aumento da D.E. de 2 a 25 em todos os três meios ensaiados, e parece existir um ótimo para valores de D.E. entre 2 e 10. Os máximos rendimentos para cada meio foram encontrados na D.E. igual a 3,30 alcançando: (i) 5,6 mmol  $\beta$ -CD; (ii) 14,7 mmol  $\beta$ -CD, e, (iii) F.C.S. 11,5 mmol  $\beta$ -CD. Para um aumento na D.E. de aproximadamente 6 vezes ( D.E. 3,30 para 22,20) o rendimento em  $\beta$ -CD diminuiu 6 vezes para os meios um e dois (com 3% de etanol), enquanto no processo F.C.S. este decréscimo foi de apenas 3,1 vezes (de 11,5 a 3,73 mmol) mostrando que este processo é menos sensível à variação da D.E. da solução de amido liquefeito.

Embora a produção de  $\beta$ -CD no processo F.C.S seja ainda relativamente baixa (3,37 mmol), este trabalho demonstra que é possível produzir  $\beta$ -CD a partir de soluções de amido de mandioca (fécula) com alta D.E (22,20), com rendimentos superiores à simples utilização de CGTase. Por exemplo, o processo F.C.S conduz a rendimentos 95 % e 54% superiores àqueles obtidos com a utilização de CGTase e CGTase com adição de 3% v/v de etanol, respectivamente.

Os resultados deste trabalho demonstraram que: (i) o amido de mandioca é uma matéria-prima adequada à produção de  $\beta$ -CD, e (ii) o processo F.C.S. é uma alternativa tecnológica potencial para a produção de CDs quando são disponíveis soluções de amido com elevada D.E.. Esta vantagem advém da eliminação simultânea e sinérgica dos açúcares inibidores concomitante produção de etanol que conduz a maiores rendimentos em CD. Trabalhos futuros terão a preocupação de otimizar as condições operacionais.

## **ENHANCED $\beta$ -CYCLODEXTRIN PRODUCTION BY SIMULTANEOUS FERMENTATION AND CYCLIZATION**

**AUTHOR: HERON OLIVEIRA DOS SANTOS LIMA**

**SUPERVISOR: PROF<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> GISELLA MARIA ZANIN**

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 - 09; 87020-900 - Maringá - PR, Brazil. defendida em 09/Setembro/1996. 136 p.  
E-mail: gisellazanin@cybertelecom.com.br

### **ABSTRACT**

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides that may be formed by different numbers of glucose units (usually from 6 to 8), linked by  $\alpha$ -1,4 bonds. The most common cyclodextrins are:  $\alpha$ -CD (cyclohexamilose),  $\beta$ -CD (cycloheptamilose) e  $\gamma$ -CD (cyclooctamilose). These cyclic maltodextrins are produced through the action of the enzyme cyclodextrin glycosyl transferase (CGTase) upon liquefied starch. The ring structure formed is highly hydrophilic on the outside because of the great numbers of hydroxyls, but relatively hydrophobic inside owing to the glycosylic bonds and hydrogen atoms that face the interior of the cavity. Thermodynamics dictates and experimentation confirms that this structure favors, in aqueous solutions, the inclusion of polar molecules, of suitable size, inside the cyclodextrin cavity. For long and complex molecules it may be its most hydrophobic parts that can be included inside the CDs. This property of CDs make them a valuable microencapsulation product at the molecular level conferring chemical and physical stabilization to the complexed substances. As a consequence of this property CDs have a broad actual and potential field of application in various industries such as: Pharmaceutical, Food, Cosmetics and Agro-industries.

The literature on the production of  $\beta$ -CD from corn and potato starches with the addition of solvents (ethanol among others) is relatively rich. In these processes reaction yield is affected by the presence of malto-oligosaccharides that not only participate in the reactions of intermolecular transglycosilation, but also function as inhibitors of the CGTase enzyme. Noteworthy among these saccharides are glucose and maltose.

Given the great potential of application of the CDs and the abundance of cassava starch, available at good price in Brazil, it was decided to study in this work the production of  $\beta$ -CD through the process of Simultaneous Fermentation and Cyclization

(SFC), offering therefore another alternative end use for a national resource. The idea of this process is to eliminate glucose and maltose by fermentation because they inhibit CD production while at the same time producing ethanol that increases CD yield. This process, in the form conceived in this work, is an original idea not previously seen in the literature.

Liquefied starch solutions of increasing Dextrose Equivalent (D.E.) were produced by hydrolyzing fécula (cassava starch) for longer periods with  $\alpha$ -amylase, 45 min. giving D.E. equal to 22.2. Hydrolysis reaction conditions were: 95°C, pH 6.0 and 10% w/v starch solution. The D.E. value was measured by Somogyi-Nelson.

A 10% w/v solution of starch, previously liquefied with  $\alpha$ -amylase, was incubated with CGTase (WACKER) using three different reaction media: the first had only CGTase, the second had CGTase plus ethanol (from 1 to 5% v/v), and the third had CGTase plus yeast, *Saccharomyces cerevisiae* (12.5% w/v), plus nutrients (triple superphosphate and ammonium sulfate, 0.15g of each). The last medium correspond to the SFC process. Reaction conditions were: 38°C, pH 6.0, D.E. from 2 to 25, and 0.5 mL of CGTase enzyme stock solution for 150 mL of reaction medium. The CGTase enzyme stock solution had 0.9967 mg of protein/mL, and an enzyme activity of 8.3  $\mu$ mol of  $\beta$ -CD/min L, measured at 38°C, pH 6.0, 1% w/v soluble starch solution. The assay method for  $\beta$ -CD was spectrophotometric based on phenolphthalein discoloring by complexation with  $\beta$ -CD. Ethanol separated by distillation was measured by gas chromatography.

The yield of  $\beta$ -CD has decreased with an increase in D.E. values from 2 to 25 in any of the reaction media, and it appears that exists an optimum for D.E. values between 2 and 10. Maximum reaction yields for each reaction media were: found for D.E. equal to 3.30 reaching for the first medium: 5.6 mmol  $\beta$ -CD; for the second: 14.7 mmol  $\beta$ -CD; and for the S.F.C process conditions 11.5 mmol  $\beta$ -CD. For an increase of D.E. of about 6 times (from 3.30 to 22.20)  $\beta$ -CD yield decreased 6 times for reaction media one and two (with 3% v/v ethanol). whereas for the S.F.C process this decay was only of 3.1 times (from 11.5 to 3.73 mmol), showing that the S.F.C process is less sensitive to variations in the D.E. of the liquefied starch solution.

Although  $\beta$ -CD yield in the S.F.C process is still low (3.73 mmol), this work has shown that it is possible to produce  $\beta$ -CD from cassava starch solutions of high D.E. (22.2), giving yields higher than using only CGTase in the same starch solution. For example, the S.F.C process gives 95% and 54% higher yields than only CGTase, and CGTase plus 3% v/v ethanol, respectively.

The results of this work have show that: (i) cassava starch is a suitable raw material for the production of  $\beta$ -CD, and (ii) the S.F.C process is an alternative technology of better potential for production of CDs when high D.E. starch solutions are available. This advantage comes from the simultaneous and synergistic elimination of inhibiting sugars with concomitant production of ethanol that lead to higher CD yields. Future work should search for optimizing reaction conditions.

**SUMÁRIO**

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
SUMÁRIO .....	ix
ÍNDICE .....	x
ÍNDICE DE TABELAS .....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xviii
1 - INTRODUÇÃO .....	01
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	03
3 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	47
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	63
5 - CONCLUSÕES .....	98
6 - RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES .....	100
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	101
8 - ANEXOS .....	108

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	03
2.1 AMIDO .....	03
2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA .....	07
2.3 ENZIMAS .....	08
2.4 ENZIMA $\alpha$ -AMILASE: Liquefação do Amido .....	09
2.5 CICLODEXTRINAS .....	11
2.5.1 Histórico .....	11
2.5.2 Definição e Estrutura .....	12
2.5.3 Características Físico-Químicas das Ciclodextrinas .....	15
2.5.4 Enzima Ciclodextrina Glicosil Transferase (CGTase) .....	19
2.5.5 Produção de Ciclodextrinas .....	24
2.5.6 Produção de $\beta$ -ciclodextrina .....	27
2.5.6.1 Processo de produção por solventes .....	27
2.5.6.2 processo de produção sem solventes .....	29
2.5.7 Efeito da Concentração de Substrato na Produção de Ciclodextrinas .....	31
2.5.8 Efeito dos Solventes Orgânicos na Produção de Ciclodextrinas ...	34
2.5.9 Preparação e Propriedades de Complexos de Inclusão com Ciclodextrinas .....	37
2.5.10 Toxicologia das Ciclodextrinas .....	41
2.5.11 Aplicações das Ciclodextrinas .....	42

2.5.11.1	Aplicação na indústria farmacêutica .....	43
2.5.11.2	Aplicação em cosméticos .....	44
2.5.11.3	Aplicação em alimentos .....	44
2.5.11.4	Aplicação em produtos agrícolas .....	45
2.5.11.5	Aplicação em produtos industrializados .....	46
2.5.11.6	Aplicações em produtos gerais .....	46
2.5.11.7	Aplicações em cromatografia .....	46
2.5.11.8	Aplicações na biotecnologia .....	46
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
3.1	MATERIAIS .....	47
3.1.1	Substrato .....	47
3.1.2	Enzima .....	47
3.1.3	Levedura .....	48
3.1.4	Reagentes Analíticos ..	48
3.1.5	Sistema Experimental .....	48
3.1.6	Equipamentos .....	50
3.2	MÉTODOS .....	50
3.2.1	Determinação de Glicose .....	50
3.2.1.1	Princípio do método .....	50
3.2.1.2	Preparação da curva padrão e análise das amostras ...	51
3.2.2	Determinação do teor de proteína .....	51
3.2.2.1	Princípio do método .....	51
3.2.2.2	Preparação da curva padrão e análise das amostras ....	52

3.2.3	Preparação da Solução de Amido Liquefeito e Determinação da Dextrose Equivalente (D.E.) .....	52
3.2.4	Determinação da $\beta$ -Ciclodextrina .....	54
3.2.5	Determinação da Atividade da Enzima CGTase .....	55
3.2.6	Efeito do pH na Atividade da CGTase .....	56
3.2.7	Influência da Concentração da Enzima CGTase na Produção de $\beta$ -CD .....	57
3.2.8	Influência dos Nutrientes Auxiliadores da Fermentação na Produção de $\beta$ -CD .....	57
3.2.9	Efeito do Etanol na Produção de $\beta$ -CD .....	58
3.2.10	Produção de $\beta$ -CD por Fermentação e Ciclização Simultânea (F.C.S.) .....	60
3.2.11	Determinação do Etanol nos Ensaios de Produção de $\beta$ -CD ....	61
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
4.1	CURVA PADRÃO DE GLICOSE E PROTEÍNA .....	64
4.1.1	Curva Padrão de Glicose .....	64
4.1.2	Curva Padrão de Proteína .....	65
4.2	PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE AMIDO LIQUEFEITO ...	66
4.2.1	Resultados Experimentais .....	66
4.2.2	Discussão dos Resultados .....	67
4.3	CURVA PADRÃO DE $\beta$ -CD .....	67
4.3.1	Resultados Experimentais .....	67
4.3.1.1	Equação da reta .....	67
4.3.1.2	Teoria da complexação .....	68

4.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CGTase ....	70
4.4.1	Resultados Experimentais .....	70
4.5	EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA CGTase .....	71
4.5.1	Resultados Experimentais .....	71
4.5.2	Discussão dos Resultados .....	72
4.6	INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA CGTase NA PRODUÇÃO DE $\beta$ -CD .....	73
4.6.1	Resultados Experimentais .....	73
4.6.2	Discussão dos Resultados .....	75
4.7	INFLUÊNCIA DOS NUTRIENTES AUXILIADORES DA FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE $\beta$ -CD .....	75
4.7.1	Resultados Experimentais .....	75
4.7.2	Discussão dos Resultados .....	77
4.8	EFEITO DO ETANOL NA PRODUÇÃO DE $\beta$ -CD .....	77
4.8.1	Resultados Experimentais .....	78
4.8.2	Discussão dos Resultados .....	79
4.9	PRODUÇÃO DE $\beta$ -CD POR FERMENTAÇÃO E CICLIZAÇÃO SIMULTÂNEAS (F.C.S.) .....	80
4.9.1	Resultados Experimentais .....	80
4.9.2	Discussão dos Resultados .....	93
4.9.2.1	Volume de CGTase 0,12 mL .....	93
4.9.2.2	Volume de CGTase 0,50 mL .....	94

<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	98
<b>6. RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES</b> .....	100
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	101
<b>8. ANEXOS</b> .....	108
8.1 ANEXO 1 - Teoria da Complexação .....	108
8.2 ANEXO 2 - Cromatogramas e Resultados das Análises do Porcentual de Etanol obtidos nos ensaios de F.C.S. ..	111

## ÍNDICE DE TABELAS

### 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Propriedades físico-químicas das principais ciclodextrinas .....	17
2.2 Métodos e principais Patentes para a produção de ciclodextrina .....	25
2.3 Produção de CD em função da concentração de amido solúvel, 60°C (5 e 10%) e 50°C (1 e 2%), pH 6,0, 44 horas .....	32
2.4 Efeito da concentração da solução de amido base seca na produção de ciclodextrina .....	33
2.5 Produção de ciclodextrinas a partir de várias fontes de amido .....	34
2.6 Resumo das principais aplicações e vantagens das CDs .....	43

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Condições de realização dos ensaios na produção de $\beta$ -CD .....	61
--	----

### 4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

4.1 Disposição geral dos ensaios realizados .....	63
4.2 Absorvâncias (Abs) obtidas para concentrações conhecidas de glicose (Cg) pelo método de Somogyi-Nelson .....	64
4.3 Absorvâncias (Abs) obtidas para concentrações conhecidas de proteína (Cp) pelo método de Bradford .....	65
4.4 Valores aproximados de Dextrose Equivalente (D.E.) em função dos tempos de reação (min) .....	66
4.5 Absorvâncias (Abs) obtidas para concentrações conhecidas de $\beta$ -CD pelo método colorimétrico da fenolftaleína .....	67
4.6 Absorvâncias (Abs) obtidas para concentrações conhecidas de $\beta$ -CD pelo método colorimétrico da fenolftaleína (Determinação da equação de complexação para cálculo das concentrações de $\beta$ -CD). $Abs_0 = 1,541$ .....	68

4.7 Relação entre $Abs_0$ , $Abs$ e $[\beta\text{-CD}]$ para determinação dos coeficientes linear e angular, para obter a equação de determinação das concentrações de $\beta\text{-CD}$ .....	69
4.8 Concentração de $\beta\text{-CD}$ (mmol) produzida em função do tempo de reação (min.) .....	71
4.9 Atividade específica da CGTase em função do pH a 38 °C .....	72
4.10 Temperaturas e pH ótimos de CGTases produzidas por <i>Bacillus</i> ..	73
4.11 Concentração de $\beta\text{-CD}$ (mmol) em função do volume de CGTase. solução de amido com D.E. de 23,5, temperatura 38°C e pH 6,0 ..	74
4.12 Concentração de $\beta\text{-CD}$ (mmol) em função do tempo de reação, para solução de amido com D.E.= 24,32, na presença e na ausência de nutrientes .....	76
4.13 Concentração de $\beta\text{-CD}$ em função do tempo de reação na ausência e presença do etanol para soluções de amido com D.E. de 12,02 e 21,81 .....	78
4.14 Concentração de $\beta\text{-CD}$ na ausência e presença de 3% v/v de etanol e por F.C.S. Solução de amido com D.E. = 22,3; 38°C e pH = 6,0; volume de CGTase = 0,12 mL .....	81
4.15 Concentração de $\beta\text{-CD}$ na ausência e presença de 5% v/v de etanol e por F.C.S. Solução de amido com D.E. = 24,32; 38°C e pH = 6,0; volume de CGTase = 0,12 mL .....	82
4.16 Concentração de $\beta\text{-CD}$ na ausência e presença de 1% v/v de etanol e por F.C.S. Solução de amido com D.E. = 2,69; 38°C e pH = 6,0; volume de CGTase = 0,50 mL .....	84
4.17 Concentração de $\beta\text{-CD}$ na ausência e presença de 3% v/v de etanol e por F.C.S. Solução de amido com D.E. = 3,30; 38°C e pH = 6,0; volume de CGTase = 0,50 mL .....	85
4.18 Concentração de $\beta\text{-CD}$ na ausência e presença de 3% v/v de etanol e por F.C.S. Solução de amido com D.E. = 6,93; 38°C e pH = 6,0; volume de CGTase = 0,50 mL .....	87
4.19 Concentração de $\beta\text{-CD}$ na ausência e presença de 5% v/v de etanol e por F.C.S. Solução de amido com D.E. = 9,87; 38°C e pH = 6,0; volume de CGTase = 0,50 mL .....	88

4.20	Concentração de $\beta$ -CD na ausência e presença de 5% v/v de etanol e por F.C.S. Solução de amido com D.E. = 17,18; 38°C e pH = 6,0; volume de CGTase = 0,50 mL .....	90
4.21	Concentração de $\beta$ -CD na ausência e presença de 5% v/v de etanol e por F.C.S. Solução de amido com D.E. = 22,20; 38°C e pH = 6,0; volume de CGTase = 0,50 mL .....	91
4.22	Porcentual de etanol obtido nos ensaios de Fermentação e Ciclização Simultâneas (F.C.S.) .....	91
4.23	Concentração de $\beta$ -CD (mmol) em função da D.E. da solução de amido liquefeito e do volume de CGTase na ausência e presença de etanol e por F.C.S. ....	95

## 8. ANEXOS

8.1	Resultados do Cromatograma da solução de F.C.S. obtidos com solução de amido com D.E. = 22,30 .....	111
8.2	Resultados do Cromatograma da solução de F.C.S. obtidos com solução de amido com D.E. = 24,32 .....	111
8.3	Resultados do Cromatograma da solução de F.C.S. obtidos com solução de amido com D.E. = 2,69 .....	112
8.4	Resultados do Cromatograma da solução de F.C.S. obtidos com solução de amido com D.E. = 3,30 .....	112
8.5	Resultados do Cromatograma da solução de F.C.S. obtidos com solução de amido com D.E. = 6,93 .....	113
8.6	Resultados do Cromatograma da solução de F.C.S. obtidos com solução de amido com D.E. = 9,87 .....	113
8.7	Resultados do Cromatograma da solução de F.C.S. obtidos com solução de amido com D.E. = 17,18 .....	114
8.8	Resultados do Cromatograma da solução de F.C.S. obtidos com solução de amido com D.E. = 22,20 .....	114

## ÍNDICE DE FIGURAS

### 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Representação da cadeia reta da amilose .....	04
2.2 Representação esquemática da forma helicoidal da amilose .....	04
2.3 Estrutura da amilose em solução aquosa. (a) espiral rígida; (b) espiral flexível segmentada; (c) espiral aleatória .....	05
2.4 Representação esquemática da amilopectina .....	05
2.5 Diagrama esquemático dos três tipos de cadeia presentes na representação ramificada da amilopectina .....	06
2.6 Formação de dextrinas cíclicas e lineares a partir do amido .....	12
2.7 Estrutura geral da $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ -ciclodextrinas .....	13
2.8 Estrutura das ciclodextrinas e suas dimensões geométricas aproximadas .....	14
2.9 Representação esquemática da $\beta$ -ciclodextrina .....	16
2.10 Esquema de reações proposto para ação da CGTase .....	20
2.11 Processo de produção de CD por tricloroetileno .....	28
2.12 Processo de produção de ciclodextrina sem solvente com CGTase de pH alcalino .....	29
2.13 Representação esquemática de complexos hospedeiro:hóspede das principais ciclodextrinas .....	38
2.14 Representação esquemática da formação do complexo de inclusão ...	39
2.15 Representação esquemática da formação do complexo de inclusão da ciclodextrina .....	40
2.16 Processo termodinâmico hipotético da formação do complexo de inclusão da ciclodextrina .....	40

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Sistema experimental utilizado para a hidrólise da solução de amido ...	49
3.2 Sistema experimental para produção de $\beta$ -CD .....	49
3.3 Sequência reacional para determinação da influência do etanol na produção de $\beta$ -CD .....	59

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Curva padrão de glicose pelo método de Somogyi-Nelson .....	64
4.2 Curva padrão de proteína pelo método de Bradford .....	65
4.3 Concentração de Dextrose Equivalente (D.E.) em função do tempo de hidrólise .....	66
4.4 Curva padrão para dosagem de $\beta$ -CD (mmol) pelo método colorimétrico da fenolftaleína .....	68
4.5 Curva padrão de $\beta$ -CD (mmol) pela teoria da complexação .....	69
4.6 Equação da reta para determinação dos coeficientes linear e angular .	70
4.7 Concentração de $\beta$ -CD (mmol) produzida em função do tempo de reação (min.) .....	71
4.8 Atividade específica da CGTase em função do pH da solução, a 38°C	72
4.9 Produção de $\beta$ -CD em função do volume de CGTase. Solução de amido com D.E. de 23,5 a 38°C, pH 6,0 .....	74
4.10 Concentração de $\beta$ -CD (mmol) em função do tempo de reação para a solução de amido liquefeito com D.E. = 24,32 na presença e na ausência de nutrientes .....	77
4.11 Produção de $\beta$ -CD em função do tempo de reação na ausência e na presença de etanol, e com soluções de amido com D.E. = 12,02 e 21,81 .....	79
4.12 Concentração de $\beta$ -CD (mmol) com 0,12 mL de CGTase, solução de amido com D.E. = 22,30; 38°C e pH 6,0 .....	83
4.13 Concentração de $\beta$ -CD (mmol) com 0,12 mL de CGTase, solução de amido com D.E. = 24,32; 38°C e pH 6,0 .....	83

4.14	Concentração de $\beta$ -CD (mmol) com 0,50 mL de CGTase, solução de amido com D.E. = 2,69; 38°C e pH 6,0 .....	86
4.15	Concentração de $\beta$ -CD (mmol) com 0,50 mL de CGTase, solução de amido com D.E. = 3,30; 38°C e pH 6,0 .....	86
4.16	Concentração de $\beta$ -CD (mmol) com 0,50 mL de CGTase, solução de amido com D.E. = 6,93; 38°C e pH 6,0 .....	89
4.17	Concentração de $\beta$ -CD (mmol) com 0,50 mL de CGTase, solução de amido com D.E. = 9,87; 38°C e pH 6,0 .....	89
4.18	Concentração de $\beta$ -CD (mmol) com 0,50 mL de CGTase, solução de amido com D.E. = 17,18; 38°C e pH 6,0 .....	92
4.19	Concentração de $\beta$ -CD (mmol) com 0,50 mL de CGTase, solução de amido com D.E. = 22,20; 38°C e pH 6,0 .....	92
4.20	Concentração de $\beta$ -CD, em função da D.E. da solução de amido liquefeito, na ausência e presença de etanol e por F.C.S. Volume de enzima CGTase = 0,50 mL .....	95

## 8. ANEXOS

8.1	Cromatograma da solução de F.C.S. obtida com solução de amido com D.E. = 22,30 .....	111
8.2	Cromatograma da solução de F.C.S. obtida com solução de amido com D.E. = 24,32 .....	112
8.3	Cromatograma da solução de F.C.S. obtida com solução de amido com D.E. = 2,69 .....	112
8.4	Cromatograma da solução de F.C.S. obtida com solução de amido com D.E. = 3,30 .....	113
8.5	Cromatograma da solução de F.C.S. obtida com solução de amido com D.E. = 6,93 .....	113
8.6	Cromatograma da solução de F.C.S. obtida com solução de amido com D.E. = 9,87 .....	114
8.7	Cromatograma da solução de F.C.S. obtida com solução de amido com D.E. = 17,18 .....	114
8.8	Cromatograma da solução de F.C.S. obtida com solução de amido com D.E. = 17,18 .....	115

## 1 INTRODUÇÃO

As ciclodextrinas(CDs), constituem um grupo de oligossacarídeos cíclicos semelhantes, formados por um número variável de unidades de glicose (geralmente de 6 - 8) unidas entre si por ligações  $\alpha$ -1,4. As mais comuns são:  $\alpha$ -CD (ciclohexamilose),  $\beta$ -CD (cicloheptamilose) e  $\gamma$ -CD (ciclo-octamilose). As ciclodextrinas são produzidas pela ação da enzima ciclodextrina glicosil transferase (CGTase) sobre o amido previamente liquefeito. As ciclodextrinas tem forma de cone invertido com uma cavidade interior cujo tamanho e forma são determinados pelo número de unidades de glicose (LEE & KIM, 1991). Este interior é relativamente apolar comparado com a água, e portanto formam facilmente complexos de inclusão com substâncias orgânicas. (SZEJTLI, 1988).

Os compostos de inclusão formados pelas ciclodextrinas, são cristalinos e apresentam propriedades interessantes em relação à molécula de origem. A inclusão pode aumentar a estabilidade da molécula hóspede, como por exemplo, frente ao calor, levando a uma redução na volatilidade ou aumentando a resistência térmica. Para os princípios ativos relativamente insolúveis em água, a inclusão pode melhorar sua solubilidade ou sua cinética de dissolução, por isso, as ciclodextrinas apresentam inúmeras aplicações nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos, de alimentos e defensivos agrícolas. (LEE et al., 1992; DUCHÊNE & VAUTION, 1986; BEKERS et al., 1991).

As ciclodextrinas são conhecidas há mais de um século, desde 1891, e atualmente existem mais de 600 artigos publicados, discutindo a inclusão molecular. Esta significativa quantidade de pesquisas, somada ao constante aumento do número de patentes nos últimos 20 anos, reflete o crescente interesse nas ciclodextrinas, que vai desde uma curiosidade científica até uma efetiva aplicação na área industrial (SZEJTLI, 1988).

A capacidade de formar complexos de inclusão das ciclodextrinas, é conhecida há mais de 50 anos, porém, o grande passo para produção em nível industrial das ciclodextrinas aconteceu em 1969, com a descoberta feita por HORIKOSHI (1971), que isolou uma linhagem de *Bacillus* produtor de uma CGTase que convertia o amido em ciclodextrina com grande rendimento. Desde então, iniciaram-se as pesquisas sobre microorganismos potencialmente produtores de CGTase, e que apresentassem maior especificidade durante a conversão do amido, ou seja, produzir principalmente  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ -ciclodextrina.

Muitos trabalhos e patentes descrevem a produção de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrina pela enzima ciclomaltodextrina (CGTase) extraída de vários microorganismos tais como: *Bacillus macerans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus alkalophilic sp*, entre outros, todos com características e afinidade de produção diferentes.

A produção de ciclodextrina a partir de amido liquefeito é um processo bastante estudado, principalmente com baixa dextrose equivalente (D.E.), entre 1 e 5. Foram muito utilizados o amido de batata, de milho e dextrinas lineares, uma vez que

estas são as matérias-primas mais abundantes nos países que atualmente produzem CDs em nível industrial (Hungria e Japão).

A procura de insumos que favoreçam uma maior produção de ciclodextrinas tem sido preocupação comum a diversos autores. Trabalhos recentes mostram a grande influência da adição de alguns solventes orgânicos no aumento desta produção, e o etanol tem se mostrado o mais favorável devido sua natureza não tóxica (LEE & KIM, 1991).

Tendo em vista a disponibilidade de fécula (amido de mandioca) no Brasil, a um custo relativamente baixo, o objetivo global deste trabalho foi estudar a produção de  $\beta$ -CD a partir de uma solução com concentração nominal a 10% p/v de amido de mandioca liquefeito com enzima  $\alpha$ -amilase, com valores de Dextrose Equivalente (D.E.) compreendidos entre 2 e 25, empregando-se três meios reacionais: (i) contendo somente enzima CGTase; (ii) com CGTase e adição de 1 a 5% v/v de etanol, e, (iii) com CGTase mais levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e nutrientes (0,15g de superfosfato triplo e sulfato de amônia), sendo este o processo de Fermentação e Ciclização Simultâneas (F.C.S.), todos em pH 6,0 e 38°C. No processo F.C.S. procura-se somar as vantagens oriundas da remoção da glicose e maltose (inibidores da CGTase) pela fermentação, com aquelas benéficas da presença do etanol que ao se complexar com a  $\beta$ -CD a torna menos susceptível à degradação pela CGTase (reações de acoplamento e desproporcionamento) bem como reduzindo a ação hidrolítica da CGTase sobre o amido, buscando-se dessa forma aumentar o rendimento da reação. Dessa forma procurou-se demonstrar a potencialidade da tecnologia F.C.S. na produção de  $\beta$ -CD a partir de uma matéria-prima nacional.

Os principais objetivos específicos que se buscou atingir com a realização deste trabalho foram: (i) implantar a metodologia de análise de  $\beta$ -CD; (ii) desenvolver a metodologia de produção de amido liquefeito com diferentes valores de D.E.; (iii) delinear as condições operacionais úteis na identificação das variáveis do processo (pH; temperatura; concentração de enzima; adição de nutrientes e de etanol); e, (iv) produção de  $\beta$ -CD por F.C.S.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Apresentar-se-á, neste capítulo, uma visão geral dos diferentes aspectos que estão envolvidos no presente trabalho e considerados relevantes. O enfoque será dado aos seguintes tópicos: **(i)** amido; **(ii)** fermentação alcoólica; **(iii)** enzimas; **(iv)** enzima  $\alpha$ -amilase, **(v)** enzima ciclodextrina glicosil transferase; **(vi)** produção de ciclodextrinas; e **(vii)** aplicações das ciclodextrinas.

### 2.1 AMIDO

O amido pode ser encontrado em todas as partes da maioria das plantas superiores, sendo, depois da celulose, a principal substância glicosídica sintetizada pelos vegetais, por ação da energia solar. Quimicamente é um carboidrato formado por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio na razão 6:10:5 ( $C_6H_{10}O_5$ ), podendo ser considerado como um polímero de condensação da glicose, constituído de unidades de anidroglicose ligadas entre si pelo oxigênio do carbono **C<sub>1</sub>** de uma, ao carbono **C<sub>4</sub>** da outra (Figura 2.1), chamadas **ligações glicosídicas**, que são estáveis em condições alcalinas e hidrolisáveis em meios ácidos. A unidade de glicose terminal da cadeia polimérica tem um grupo aldeído livre ou potencialmente livre, conhecido como **grupo redutor** ou **extremidade redutora do amido**, que pode ser oxidado para formar outros produtos.

As principais fontes comerciais de amido são os grãos cereais (milho, trigo, sorgo e arroz), tubérculos (batata), raízes (mandioca, batata doce e araruta) e o sagu. As propriedades físicas e químicas do amido dependem de onde é originário.

O grânulo de amido natural é um produto heterogêneo de alto peso molecular, sendo que esta característica é atribuída à existência de dois polissacarídeos de estrutura e peso molecular diferentes: **amilose** e **amilopectina**, as quais são formadas por um mecanismo de biossíntese ainda não inteiramente conhecido, e cujas proporções variam de acordo com a origem do amido. Por exemplo, na mandioca o amido está presente na proporção média de 26% base seca, contendo aproximadamente 1% de proteína, 0,3% de gordura e 1% de fibras, apresentando um grânulo oval truncado com diâmetro médio de 20  $\mu\text{m}$  e da ordem de 17% de amilose e 83% (p/p) de amilopectina, esta última com um peso molecular médio de  $2 \times 10^6$  (SWINKELS, 1985).

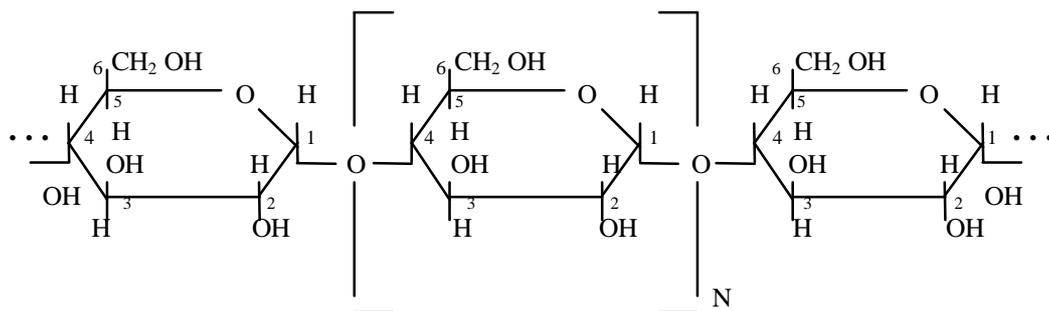


FIGURA 2.1 Representação da cadeia reta da amilose (CIACCO & CRUZ, 1980).

Na forma cristalina, a molécula de amilose apresenta uma conformação helicoidal, como mostrado na Figura 2.2. Esta hélice, devido à configuração das unidades de glicose, tem um interior hidrofóbico.

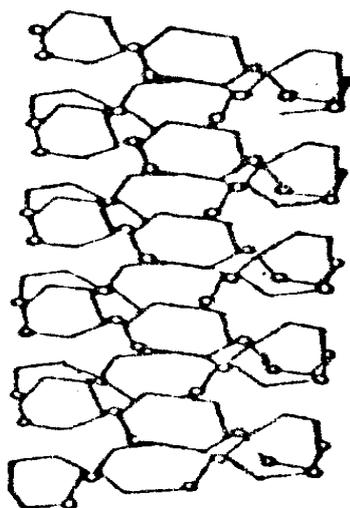


FIGURA 2.2 Representação esquemática da forma helicoidal da amilose ( CIACCO & CRUZ, 1980).

Por algum tempo duas hipóteses conflitantes procuravam explicar o comportamento da amilose em solução aquosa, estas eram: **(i)** a molécula dissolvida formava uma espiral na qual os segmentos helicoidais eram unidos de modo desordenado, e, **(ii)** a molécula assumia uma forma de espiral completamente aleatória e desordenada. Estas hipóteses conduziam a se ter três formas possíveis: espiral rígida, a hélice interrompida e a espiral aleatória, conforme mostrado na Figura 2.3 (WHISTLER & DANIEL, 1984; SZEJTLI, 1991).

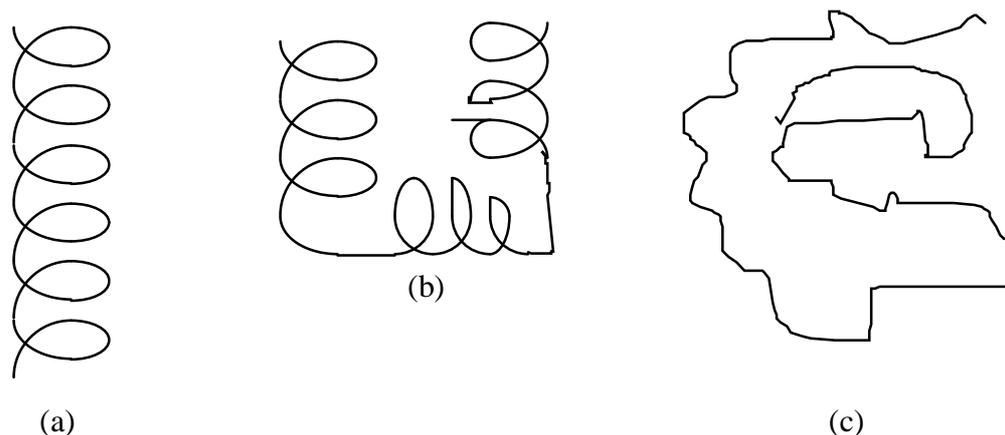


FIGURA 2.3 Estrutura da amilose em solução aquosa. (a) espiral rígida; (b) espiral flexível segmentada; (c) espiral aleatória.

De acordo com SZEJTLI (1991) a hipótese atualmente aceita é a de que a amilose, em solução aquosa, comporta-se como uma espiral aleatória (Figura 2.3.c), que consiste de segmentos helicoidais estendidos unidos por regiões deformadas não helicoidais, que em presença de agentes complexantes apropriados, como por exemplo o iodo, formam uma estrutura helicoidal mais rígida (Figura 2.3.a)

A amilopectina é uma macromolécula ramificada, formada pela associação de 20 - 30 unidades de glicose unidas entre si por ligações  $\alpha$ -1,4, ligadas à cadeia de amilose através das ligações  $\alpha$ -1,6, como mostrado na Figura 2.4 (SWINKELS, 1985).

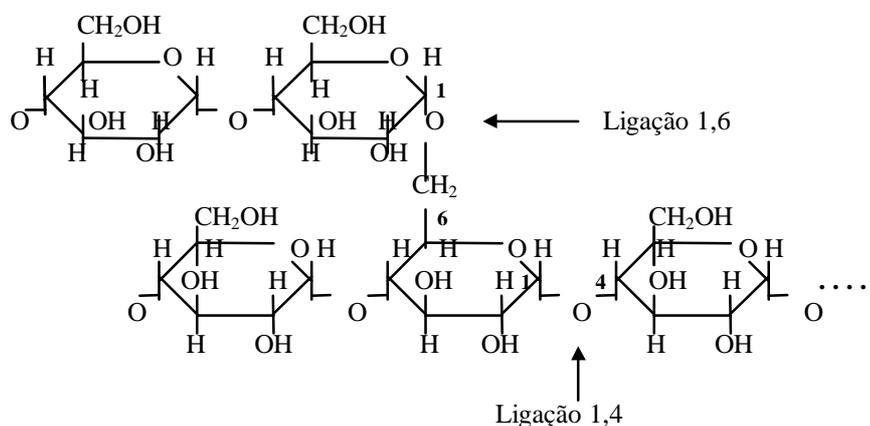


FIGURA 2.4 Representação esquemática da amilopectina ( SWINKELS, 1985).

Esta ramificação da amilopectina pode ser diferenciada por três tipos de cadeia: **A**- cadeias curtas de amilose sem grupos OH no carbono 6 comprometido; **B**- cadeias com um ou mais grupos OH no carbono 6 comprometido; e **C**- cadeias com grupo redutor. A Figura 2.5 ilustra os três tipos de cadeia (CIACCO & CRUZ, 1980).

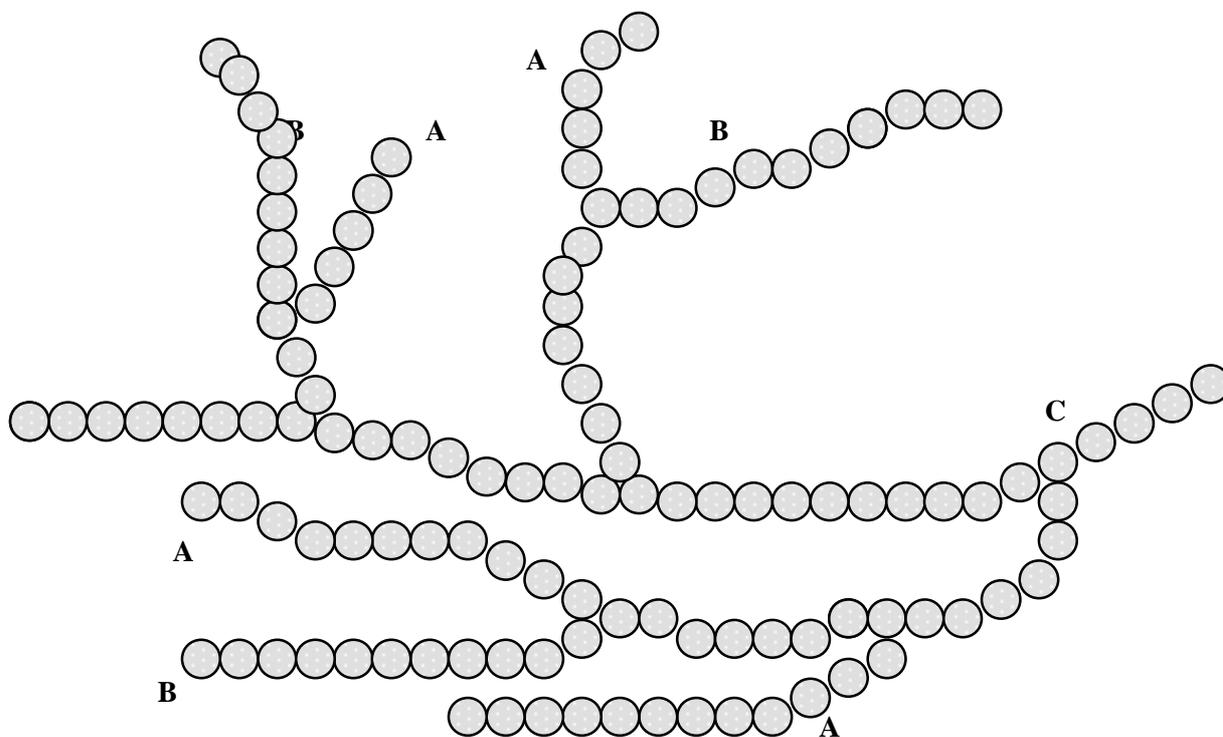


FIGURA 2.5 Diagrama esquemático dos três tipos de cadeia presentes na representação ramificada da amilopectina (CIACCO & CRUZ, 1980).

As cadeias externas, na maioria das amilopectinas, têm em média, 12 unidades de glicose. Como, em média, a cadeia total contém 20 unidades de glicose e cada cadeia é ramificada apenas uma vez, o tamanho médio da cadeia no interior das amilopectinas é de 8 unidades de glicose (CIACCO & CRUZ, 1980). Seu peso molecular médio é da ordem de 200 milhões (SWINKELS, 1985).

Em termos estruturais, o grânulo de amido é constituído por moléculas de amilose e amilopectina associadas entre si por pontes de hidrogênio entre grupos **OH** vizinhos formando áreas cristalinas radialmente orientadas. São essas áreas que mantêm a estrutura do grânulo e controlam o comportamento do amido na água.

As pontes de hidrogênio são as responsáveis pela insolubilidade do amido em água fria. Com o aquecimento da suspensão provoca-se a ruptura destas pontes e conseqüentemente sua hidratação, fenômeno este que é conhecido como gelatificação e caracteriza-se pelo aumento da viscosidade da suspensão. Geralmente a faixa de temperatura onde ocorre a gelatificação é característica de cada tipo de amido - para o amido de mandioca ela ocorre a 63 °C (PARK et al, 1971).

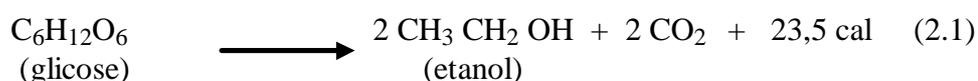
A reação enzimática da amilose e das ligações  $\alpha$ -1,4 dos segmentos de amilopectina, produz as ciclodextrinas.

## 2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

O termo fermentação é derivado do verbo latim, *fervere*, ferver, o qual descreve a aparência da ação das leveduras sobre materiais açucarados (STANBURY & WHITAKER, 1984).

Do ponto de vista econômico, as leveduras são os microorganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. As espécies mais usadas são as *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum* (LIMA et al, 1975).

A fermentação alcoólica como um todo, pode ser representada pela equação de Gay-Lussac, que serve de base para cálculos de eficiência (equação 2.1):



Pela estequiometria, partindo-se de 1 mol de glicose, 51,1% seria transformado em álcool e 48,9% em dióxido de carbono. A produção teórica de álcool é usualmente considerada como 95% do álcool esperado com base na transformação química de açúcar a álcool, assumindo que os 5% restante de açúcar destina-se ao crescimento celular e produtos secundários.

No preparo do meio, a condição de reação que favorece a levedura e inibe o desenvolvimento de muitos tipos de bactérias, situa-se em pH entre 3,5 e 5,0 (LIMA et al., 1975).

A faixa de temperatura recomendada para a fermentação alcoólica está entre 25 e 36°C. Temperaturas inferiores ao limite retardam a fermentação e temperaturas superiores provocam a evaporação do álcool e favorecem o aparecimento de contaminações. Para evitar as infecções por bactérias e inibir as fermentações secundárias é utilizado como antisséptico, o pentaclorofenol e produtos derivados, na proporção de 0,01 a 0,05g por litro de mosto (LIMA et al., 1975).

No processo fermentativo, uma etapa essencial é a relativa à formulação do meio, que deve conter os elementos necessários ao crescimento e manutenção das

células, sendo os principais elementos nutritivos: carbono, nitrogênio e fósforo e traços de outros minerais, como: magnésio, potássio, enxofre entre outros (STANBURY & WHITAKER, 1984).

As fontes mais importantes de carbono são os carboidratos, normalmente presentes nos materiais amiláceos e sacaríneos.

O fósforo é um elemento translocador de energia, ligado diretamente ao ciclo da fermentação, enquanto o nitrogênio é um elemento de formação plástica, importante ao crescimento de leveduras. Uma suplementação de 1,0g /L de mosto, aplicado na forma de solução, de cada uma destas fontes (sulfato de amônio e superfosfato triplo) é suficiente para se obter melhores resultados de fermentação, rendimento e qualidade do produto final (LIMA et al., 1975).

As matérias amiláceas, como o amido de mandioca, só fermentam após serem submetidas a um processo de hidrólise e sacarificação, uma vez que as leveduras não possuem enzimas amilolíticas. Tanto o processo de hidrólise como a sacarificação conduzem à formação de açúcares fermentescíveis, oriundos da amilose e amilopectina, especialmente glicose.

As leveduras da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* têm a capacidade de metabolizar a glicose e a maltose (SZEJTLI, 1982; WHISTLER et al., 1984), também a maltotriose pode ser consumida pelas leveduras, porém oligossacarídeos superiores não podem ser utilizados.

## 2.3 ENZIMAS

A principal característica da maioria das reações bioquímicas é de transcorrerem com grande rapidez devido a ação de catalisadores naturais chamados **enzimas**. Pode-se descrever as enzimas como catalisadores complexos de origem biológica, formadas basicamente por proteínas, com uma grande especificidade e enorme eficiência. Muitas das reações não ocorreriam em extensão apreciável ou simplesmente não aconteceriam sem a participação das enzimas. Assim como os catalisadores inorgânicos, as enzimas podem ser recuperadas no final da reação (WHITE et al., 1964).

Segundo Dixon & Weeb (1979), citados por ZANIN (1989), a catálise enzimática tem basicamente o mesmo mecanismo de uma catálise inorgânica. A enzima faz com que a reação ocorra através do caminho energético diferente, por uma via que envolve uma energia de ativação menor. Esta variação não altera, entretanto, nem a constante de equilíbrio nem a energia livre da reação.

Uma grande vantagem das enzimas sobre os catalisadores químicos é que elas possuem uma alta especificidade ao substrato, o que leva a um rendimento maior na reação e uma baixa formação de subprodutos. Além disso, as reações enzimáticas tem um baixo consumo de energia e ocorrem em condições de reação suaves (temperatura, pressão e pH). No entanto, as reações enzimáticas tem uma alta sensibilidade à variações de temperatura e pH, e a separação catalisador/produto é difícil e dispendiosa (BAILEY & OLLIS, 1986; ZANIN, 1989).

Além da quantidade de enzima presente, existem vários fatores que influenciam a atividade enzimática. Os principais são (DIXON & WEEB, 1979; BAILEY & OLLIS, 1986; ZANIN, 1989):

- (i) - **pH**: pelo fato das enzimas serem proteínas, o caráter iônico dos grupos amino e grupos carboxílicos da proteína são afetados pelas mudanças de pH. Valores altos ou baixos de pH podem causar a desnaturação, e as vezes até a completa inativação da enzima;
- (ii) - **temperatura**: a reação enzimática é sensível à mudança de temperatura. Devido à natureza protéica de uma enzima, aumentando-se a temperatura ocorrerá uma desnaturação térmica, com conseqüente redução da concentração efetiva, implicando no decréscimo da velocidade de reação;
- (iii)- **concentração do substrato**: a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima depende diretamente da concentração desta. Se a concentração do reagente ou substrato é aumentada, mantendo-se fixa a concentração da enzima e as demais condições, observa-se que a atividade enzimática atinge um máximo, além do qual não se tem efeito adicional mesmo quando se aumenta a concentração do substrato;
- (iv)-**concentração de qualquer ativador presente**: certas substâncias são capazes de ativar as reações enzimáticas. Esta ativação pode ser resultado da ação de um íon inorgânico como  $K^+$  ou  $Na^+$ , sobre a velocidade de reação. Muitas coenzimas ou grupos prostéticos são agentes ativadores;
- (v)-**concentração de qualquer inibidor presente**: ao contrário dos ativadores, o efeito dos inibidores é diminuir a velocidade de reação.

## 2.4 ENZIMA **a** - AMILASE : Liquefação do Amido

A degradação do amido em glicose via enzimática, ocorre com a participação das **enzimas amilases**, pertencentes ao grupo das hidrolases glicosídicas. Estas enzimas são facilmente encontradas na natureza ocorrendo nas secreções digestivas dos animais, plantas e microorganismos.

As amilases podem ser classificadas de acordo com o tipo de ligação glicosídica que hidrolisam. Dessa forma, diferentes hidrolases tem sido utilizadas no processo de hidrólise do amido, podendo-se citar:  $\alpha$ -amilase bacteriana, amiloglicosidase, pululanase, isoamilase,  $\beta$ -amilase e a  $\alpha$ -amilase fúngica. Destas as mais empregadas nos processos industriais são a  $\alpha$ -amilase e a amiloglicosidase (REILLY, 1985).

A  $\alpha$ -amilase é uma endoenzima que hidrolisa, preferencialmente, as ligações  $\alpha$ -1,4 internas à amilose, amilopectina e glicogênio, não atuando nas ligações  $\alpha$ -1,6, e que segundo resultados de Fogarty & Kelly (citados por ZANIN, 1989) parece não ser capaz de hidrolisar as três ligações  $\alpha$ -1,4 próximas à ligação  $\alpha$ -1,6 do ponto de ramificação.

Devido ao fato de serem enzimas que atuam no interior da molécula, a partir da extremidade não redutora, sua ação é notada pelo rápido decréscimo da cor na reação com iodo, juntamente com a redução da viscosidade da solução à medida que a reação prossegue (REILLY, 1985; ZANIN, 1989).

A hidrólise da amilose e amilopectina pela  $\alpha$ -amilase de *Bacillus licheniformis* produz, inicialmente  $\alpha$ -dextrinas limite, como: maltopentose (G5) e superiores - maltohexose (G6) e maltoheptose (G7), sendo posteriormente formados G5, maltotriose (G3), maltose (G2), glicose (G) e maltotetraose (G4) em ordem decrescente. A velocidade de hidrólise decresce rapidamente à medida que diminui o comprimento da cadeia polimérica; G<sub>2</sub> e G<sub>3</sub> não são hidrolisados (REILLY, 1985).

O peso molecular da  $\alpha$ -amilase de *B. licheniformis* é da ordem de 50 000, o pH ótimo, tanto para atividade como para estabilidade é praticamente o mesmo, na faixa de 5,5 - 6,5. Por ser uma enzima termoestável, a temperatura ótima de reação situa-se entre 85 - 95°C. Estabilidade elevada é conseguida na presença de íons cálcio, por se tratar de uma metalo-enzima (NOVO, 1983; REILLY, 1985).

A produção de xaropes com baixa dextrose equivalente (D.E.), normalmente, é realizada submetendo-se a solução de amido à ação da enzima  $\alpha$ -amilase (REILLY, 1985).

Segundo PARK et al. (1971), as condições ótimas de liquefação do amido de mandioca são: pH próximo a 6,0 e temperatura de 85°C com aquecimento lento e constante, podendo variar conforme a origem da enzima.

## 2.5 CICLODEXTRINAS

## 2.5.1 HISTÓRICO

As ciclodextrinas foram isoladas pela primeira vez em 1891 por Villiers, a partir de um meio contendo amido onde estava crescendo uma cultura de *Bacillus amylobacter*. Este pesquisador observou a existência de uma substância cristalina, que caracterizou fisicamente, inclusive a solubilidade. Este pesquisador denominou seu produto cristalino como “celulosina”, devido sua similaridade com a celulose (relativamente estável à hidrólise), e também verificou a existência de duas espécies diferentes de celulosina (SZEJTLI, 1982).

Segundo citação de SZEJTLI (1982), Schardinger entre 1903 e 1911 observou que a celulosina de Villiers era frequentemente formada nos meios de cultura que continham amido. Em 1903 - 1904, este pesquisador isolou o *Bacillus macerans*, que é o microorganismo mais utilizado para a produção de ciclodextrinas. Ainda, em 1904 Schardinger caracterizou as ciclodextrinas como oligossacarídeos cíclicos, bem como descreveu as formas de prepará-las e suas propriedades físicas e químicas, verificando que estas estavam de acordo com aquelas determinadas por Villiers em 1891. Na literatura sobretudo na mais antiga, as ciclodextrinas são denominadas como “dextrinas de Schardinger”.

Conforme citação de SZEJTLI (1982), após a última publicação de Schardinger em 1911, os 24 anos seguintes não foram muito produtivos no campo da pesquisa sobre a química das ciclodextrinas. Nesse primeiro período. Pringsheim liderou as pesquisas sobre CDs, e relatou o poder complexante dessas moléculas.

No segundo período, que compreende aproximadamente, o período entre 1935 e 1970, segundo citação de SABIONI (1991), em 1938 Freudenberg e colaboradores relataram que as ciclodextrinas são constituídas de unidades de glicose unidas pela ligação  $\alpha$ -1,4, como na amilose. Em 1942, French & Rundle estabeleceram o peso molecular e o número de unidades de glicose para o  $\alpha$  e  $\beta$ -CD. O peso molecular e o número de unidades de glicose da  $\gamma$ -CD foram estabelecidos por Freudenberg & Cramer entre 1945 e 1950. Ainda confirmaram a capacidade das ciclodextrinas de formarem compostos de inclusão, e elaboraram processos de síntese de ciclodextrinas puras, o que também foi realizado mais tarde por FRENCH (1957). Em 1954, Dietrich & Cramer, realizaram estudos sistemáticos da formação de complexos de inclusão envolvendo as ciclodextrinas e outros compostos, e ainda reportaram que as CDs atuam como catalisadores em algumas reações. Também descreveram a resolução de racematos com o emprego de ciclodextrinas.

O terceiro período, caracterizou-se por um grande número de publicações e patentes, estudos toxicológicos e início da produção industrial das CDs (SZEJTLI, 1988). Em 1979, Horikoshi apresentou um processo de obtenção de ciclodextrinas com baixo custo, utilizando a CGTase do *Bacillus 38-2, alkalophilic*. A empresa japonesa Nihon Shokuhin KaKo Co (NSKK), produz as ciclodextrinas em escala industrial, sob a denominação de CELDEX (NSKK, 1983). No Japão a produção industrial atinge 600

t/ano, e a maior parte do produto tem sido utilizada pela indústria alimentícia (Shiraishi et al., 1989, citado por SABIONI, 1991).

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

A literatura sobre as ciclodextrinas tem crescido exponencialmente durante a última década. Enquanto em 1984 haviam 425 trabalhos disponíveis, incluindo patentes e resumos de congressos, em 1994 esse número saltou para 1421, o que corresponde a aproximadamente 3,9 publicações/dia em 1994, contra apenas 1,2/dia em 1984. Comportamento semelhante, ocorre com o número de patentes, que passaram de 441 em 1980 - 85 para 1189 em 1990 - 95 (BENES & SZEJTLI, 1996).

## 2.5.2 DEFINIÇÃO E ESTRUTURA

A hidrólise enzimática do amido, de um modo geral, resulta na produção de glicose, maltose, maltotriose e uma série de malto-oligossacarídeos lineares ou ramificados, conhecidos como **dextrinas** (SZEJTLI, 1988).

As dextrinas são substâncias heterogêneas, amorfas e higroscópicas, muito utilizadas nas indústrias alimentícias, têxteis e de papel, entre outras.

A degradação da molécula de amido pela enzima **ciclodextrina glicosil transferase (CGTase)**, conduz à formação de produtos cíclicos que contêm ligações  $\alpha$ -1,4, conhecidas como **ciclodextrinas (CDs)**, que são obtidas a partir de uma reação intramolecular onde não há participação de moléculas de água (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994). Na Figura 2.6 apresenta-se um esquema simplificado do processo.

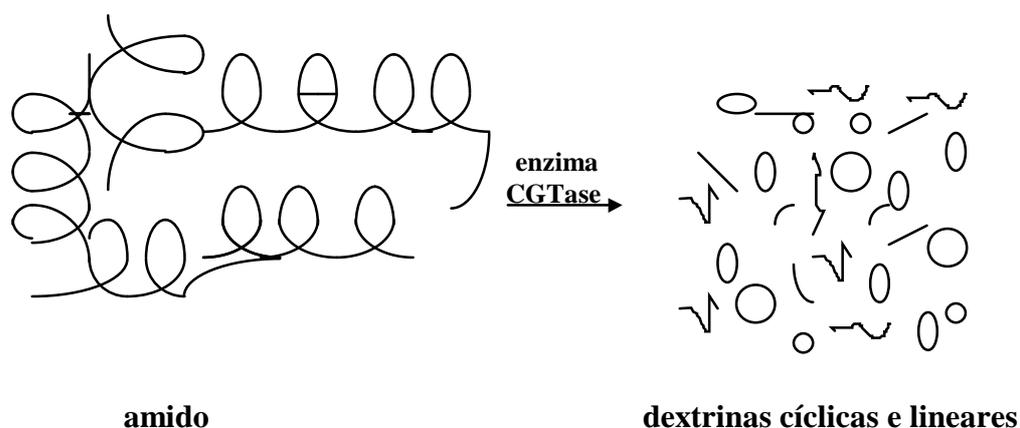


FIGURA 2.6 Formação de dextrinas cíclicas e lineares a partir do amido (SZEJTLI, 1988).

A enzima utilizada é um biocatalisador, cuja única função é auxiliar os poliglucanos a atingirem a conformação termodinamicamente mais estável, onde os

segmentos helicoidais são convertidos em anéis fechados. A facilidade com que as ciclodextrinas são formadas e com alto rendimento, é uma maneira indireta de se provar a existência da estrutura helicoidal da amilose quando em solução aquosa (SZEJTLI, 1991).

As ciclodextrinas, industrialmente produzidas, constituem uma família de três oligossacarídeos cíclicos, derivados da glicose, não-redutores, não-higroscópicos, hidrossolúveis e cristalizáveis que podem ser cristalizados e obtidos na forma pura (CRAMER, 1987; SZEJTLI, 1988; PREMA et al. 1990; FUJIWARA et al., 1992; LEE et al., 1992; FRÖMMING & SZEJTLI, 1994). São denominadas **a**, **b** e **g** de acordo com o número de unidades de glicose.

A **a-ciclodextrina**, também conhecida como  $\alpha$ -dextrina de Schardinger, ciclomaltohexaose, ciclohexaglucona, ciclohexamilose, **a-CD**, ACD e C6A é constituída por 6 unidades de glicose. A **b-ciclodextrina**, ou  $\beta$ -dextrina de Schardinger, cicloheptaose, cicloheptaglucona, cicloheptamilose, **b-CD**, BCD e C7A é formada por 7 unidades de glicose. A **g-ciclodextrina**, também conhecida como  $\gamma$ -dextrina de Schardinger, ciclomalto-octaose, ciclo-octaglucona, ciclo-octamilose, **gCD**, GCD e C8A é formada por 8 unidades de glicose (SZEJTLI, 1988; FRÖMMING & SZEJTLI, 1994). A Figura 2.7 mostra a estrutura geral das principais ciclodextrinas (SICARD & SANIEZ, 1987).

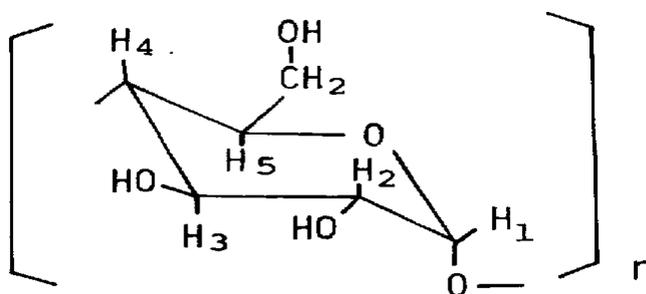


FIGURA 2.7 Estrutura geral da  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas ( $n = 6, 7$  e  $8$ , respectivamente).

As CDs são moléculas que apresentam a forma de um tronco de cone invertido com uma cavidade interior cujo tamanho e forma são determinados pelo número de unidades de glicose. Esta forma cônica deve-se à conformação C1 dos resíduos de  $\alpha$ -D-glicopiranosil e a ausência de livre rotação ao redor das ligações glicosídicas. Os grupos hidroxila secundários (nos átomos C2 e C3 das unidades de glicose) estão situados de um dos lados do anel e todas as hidroxilas primárias do outro lado. Isto confere às CDs a propriedade de serem hidrofílicas externamente. O lado das hidroxilas secundárias é mais largo que o lado das hidroxilas primárias (base do tronco do cone). O interior da molécula é composto pelos grupos CH e oxigênio glicosídico, o que o torna relativamente apolar em relação à água (SZEJTLI, 1988; BEKERS et al.,

1991; LEE & KIM , 1991). Portanto , o interior da cavidade apresenta um microambiente hidrofóbico, enquanto o exterior mostra uma superfície hidrofílica. Esta característica favorece a inclusão de compostos orgânicos em seu interior, isto é, encapsulação molecular, que tem sido muito estudada devido sua importância para a compreensão das interações enzima - substrato e princípio ativo - receptor (TAWARAH & KHOURI, 1993). A estrutura e as dimensões características da  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD são mostradas na Figura 2.8.

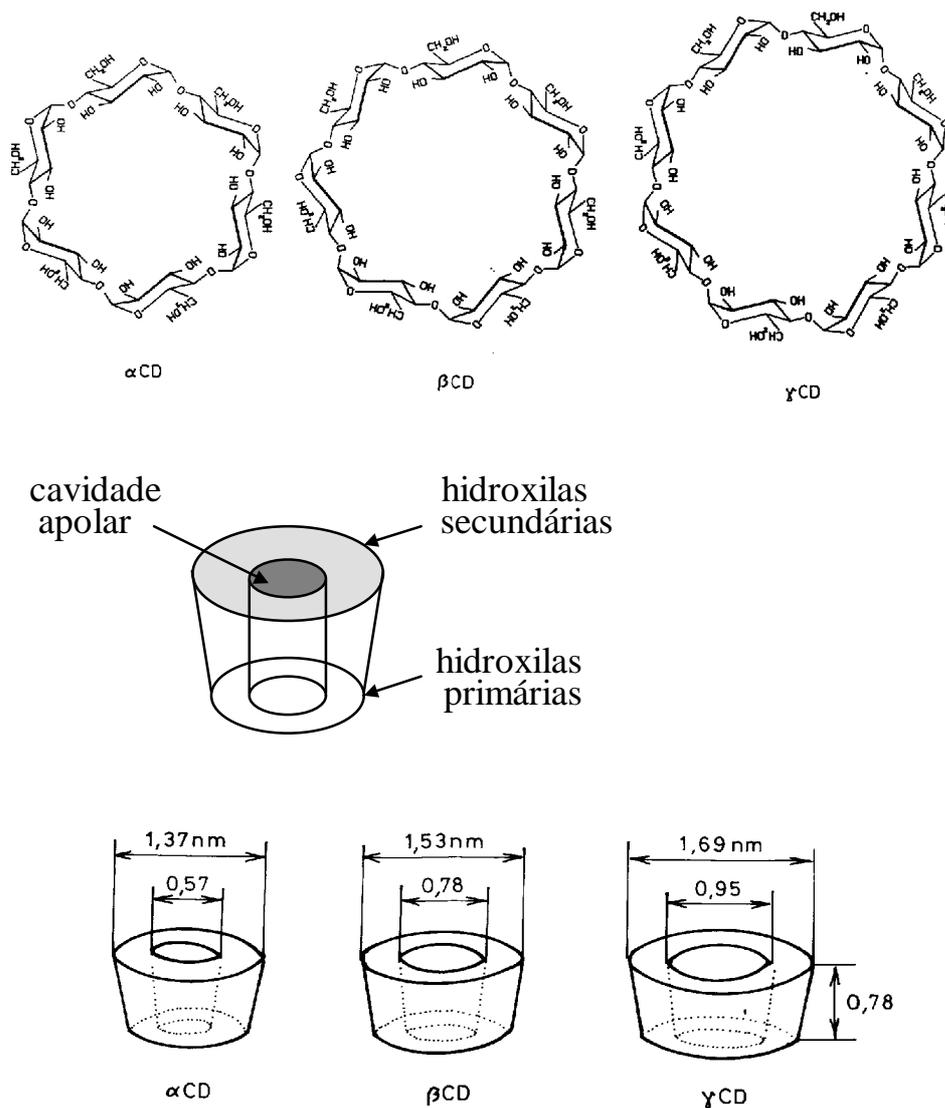


FIGURA 2.8 Estrutura das ciclodextrinas e suas dimensões geométricas aproximadas (SZEJTLI, 1988).

Ciclodextrinas inferiores à  $\alpha$ -CD, isto é, com menos que cinco unidades de glicose no anel não podem ser formadas por razões estéricas. Por outro lado, homólogos superiores podem ser teoricamente produzidos, porém espera-se que estes apresentem uma elevada solubilidade em água, o que tornaria muito difícil sua separação do meio. Somente a  $\delta$ -CD, nove unidades de glicose, foi razoavelmente caracterizada, mas ainda não está sendo produzida industrialmente e pouco conhece-se sobre suas propriedades (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

### 2.5.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas são não-higroscópicas porém, formam vários hidratos estáveis. São tão estáveis quanto a sacarose ou o amido, podendo ser estocadas por diversos anos sem riscos de deterioração. Não possuem grupos redutores terminais. Por hidrólise ácida parcial produzem glicose e malto-oligossacarídeos lineares. A estabilidade das CD contra o ataque de ácidos é de 2 a 5 vezes maior do que aquela das dextrinas lineares, porém isto depende da temperatura e da acidez do meio (FROMMING & SZEJTLI, 1994).

Dos três tipos de ciclodextrinas, a  $\beta$ -CD é a mais apropriada para o uso prático, pois os complexos de inclusão são facilmente preparados e estabilizados devido ao tamanho de sua cavidade apolar ser adequado para um grande número de moléculas, tais como drogas e preservativos. Em adição, a  $\beta$ -CD é facilmente separada da mistura reacional sem a necessidade de se usar solventes orgânicos devido sua baixa solubilidade em água (LEE & KIM, 1991).

A Figura 2.9 apresenta um modelo molecular para a  $\beta$ -ciclodextrina (SAENGER, 1980). Esta estrutura requer um arranjo especial dos grupos funcionais, responsável por uma variedade de características peculiares das CD. Assim, os grupos hidroxilas dos átomos de carbono C2 e C3 da unidade de glicose estão ligados numa lateral da molécula da ciclodextrina, já os grupos hidroxilas dos átomos C6 localizam-se do lado oposto. O interior da molécula consiste de grupos de C-H e oxigênio glicosídico. Portanto, o interior das CD é relativamente apolar. A cavidade interna das ciclodextrinas tem formato de um “V”, com a hidroxila do C3 mais aberta do que a do C2. A hidroxila do C2 pode girar livremente e bloquear parcialmente a cavidade, enquanto a do C3 é relativamente rígida, não apresentando rotação (BENDER & KOMIYAMA, 1978; SABIONI, 1991).

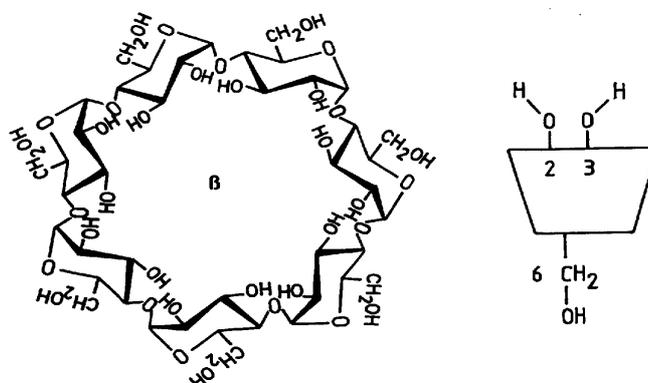


FIGURA 2.9 Representação esquemática da  $\beta$ -ciclodextrina (BENDER, 1986).

Enquanto a superfície externa possui natureza hidrofílica, a cavidade interna apresenta uma alta densidade eletrônica, devido aos hidrogênios e oxigênios glicosídicos orientados para o interior (BENDER & KOMIYAMA, 1978). Graças à natureza hidrofóbica da cavidade, moléculas de tamanho, forma e hidrofobicidade adequada são capazes de interagir de forma não-covalente, para formar um complexo estável, por inclusão molecular (HORIKOSHI, 1979; HIRAI et al., 1981; TAGUSHI, 1986).

Há muitas pontes de hidrogênio intramoleculares formadas entre as hidroxilas secundárias de unidades de glicose consecutivas, tais como os OH em C2 e C3. Estas interações estabilizam o macrociclo das ciclodextrinas e a tornam uma estrutura rígida. Esta é, provavelmente a explicação para a baixa solubilidade da  $\beta$ -CD em solução aquosa (SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991).

Por estarem orientadas para fora, as hidroxilas nos átomos C2, C3 e C6 podem sofrer ataque químico que modifica a estrutura das ciclodextrinas sem alterar a cavidade central. Isso permite que as ciclodextrinas sejam transformadas em derivados, com modificações em suas propriedades físico-químicas (SZEJTLI, 1988).

Na Tabela 2.1 são apresentadas algumas propriedades físico-químicas das ciclodextrinas (LE BAS & RYSANEK, 1987; SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991; FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

TABELA 2.1 Propriedades físico-químicas das principais ciclodextrinas (LE BAS & RYSANEK, 1987; SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991; FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

PARÂMETROS	<b>α-CD</b>	<b>β-CD</b>	<b>γ-CD</b>
Número de unidades de glicose	6	7	8
Peso molecular	972	1135	1297
Solubilidade em água a 25°C (gCD/ 100 mL)	14,5	1,85	23,2
Solubilidade em água a 35°C (mgCD/ g água)	204	28,3	390
Solubilidade em água a 45°C (mgCD/ g água)	285	44,0	585
Diâmetro da cavidade (Å <sup>o</sup> )	4,7 - 5,3	6,0 - 6,5	7,5 - 8,3
Altura do tronco (Å <sup>o</sup> )	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1
Diâmetro externo do tronco (Å <sup>o</sup> )	14,6 ± 0,4	15,4 ± 0,4	17,5 ± 0,4
Volume da cavidade em (Å <sup>o</sup> ) <sup>3</sup>	174	262	427
Volume da cavidade 1mol CD (mL)	104	1257	427
Volume da cavidade 1 g CD (mL)	0,10	0,14	0,20
Número de moléculas de água na cavidade	6	11	17
pKa (25°C)	12,3	12,2	12,1
Ponto de fusão (°C)	275	280	275
Forma do cristal (água)	placas hexagonais	paralelogramos	prismas quadráticos

Observa-se na Tabela 2.1 que a solubilidade da  $\alpha$  e  $\gamma$ -CD, são, respectivamente, da ordem de 7 e 13 vezes maior do que aquela da  $\beta$ -CD. Isto deve-se provavelmente, ao fato da  $\beta$ -CD possuir uma estrutura rígida. A solubilidade também é dependente da temperatura, sendo que esta aumenta exponencialmente com a temperatura. De um modo geral a solubilidade das ciclodextrinas decresce na presença de moléculas orgânicas, devido à formação de complexos. No caso de etanol e propanol, este comportamento não se verifica, sendo que há um máximo de concentração - solubilidade. Para a  $\beta$ -CD, a 37°C este máximo ocorre em solução aproximadamente a 25% de etanol atingindo um valor da ordem de 5,6 g/100 mL (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994). Solventes orgânicos como tolueno, bromobenzeno, tricloroetileno, entre outros, reduzem substancialmente a solubilidade das ciclodextrinas em solução aquosa, tanto que frequentemente são utilizados como precipitantes (FRENCH et al., 1949).

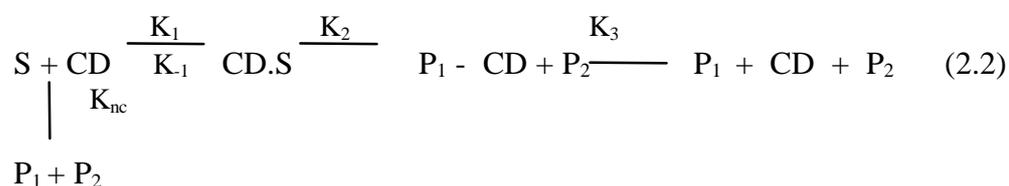
A ciclodextrina apresenta sabor adocicado; uma solução de 2,5% de  $\beta$ -CD é tão doce quanto uma solução de 1,7% de sacarose. Portanto, quando do uso da  $\beta$ -CD na síntese dos alimentos não se deve desprezar esta propriedade (SZEJTLI, 1984).

A viscosidade das soluções aquosas de ciclodextrinas não diferem significativamente da viscosidade da água. Para solução de  $\beta$ -CD com concentração de  $9,5 \times 10^{-4}$  molar (8,93 mg/mL) a 25,1°C é igual a 8,99 mP enquanto a da água, na mesma temperatura é de 8,93 mP. Uma solução de  $\beta$ -CD com concentração de  $9,98 \times 10^{-3}$  molar (11,3 mg/mL) apresenta uma viscosidade igual a 9,436 mP (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

Segundo TABUSHI et al. (1978), as ciclodextrinas exibem um comportamento semelhante ao de uma enzima, em relação ao substrato ligante, sugerindo que existe uma interação específica entre a ciclodextrina e a molécula hóspede. Ainda existem muitas dúvidas a serem esclarecidas, tais como a natureza da força de ligação, a natureza da estrutura da água em torno ou próximo do complexo de inclusão, a dinâmica molecular de inclusão, entre outras. Estes autores, pesquisando a encapsulação molecular, concluíram que as interações de Van der Waals, a energia de conformação e os grupamentos de água governam o processo de inclusão.

As ciclodextrinas possuem grupos ligantes específicos em uma das bordas e diversos grupos hidroxílicos na outra extremidade. O grupo hidroxílico é ácido, porém muito fraco ( $pK_a \cong 12$ ), podendo comportar-se como ácido em vasta faixa de pH. Em solução fortemente alcalina, dissocia-se ao ânion correspondente até certo ponto e pode agir como base. Consequentemente, as ciclodextrinas podem atuar como certas enzimas, embora com atividade catalítica limitada. Este problema pode ser resolvido pela introdução de grupos funcionais catalíticos potentes nas ciclodextrinas, como imidazol ou ácido hidroxâmico como catalisador hidrolítico eficaz, ou piridoxina como catalisador para síntese de aminoácidos (TABUSHI, 1982).

A catálise pode ser dividida em dois grupos, de acordo com a formação ou não, pelas ciclodextrinas de intermediários covalentemente ligados. No primeiro grupo, as reações podem ser representadas pela equação 2.2 (Van Etten, 1967 citado por SABIONI, 1991).



Na sequência proposta,  $K_{nc}$  é a constante para a reação sem a ciclodextrina (CD);  $K_1$  representa a constante de formação do complexo “enzima-substrato” (CD.S); e  $K_2$  descreve a formação do complexo intermediário  $P_1 - CD$ , o qual é hidrolisado de acordo com  $K_3$  para formar a ciclodextrina e o produto final ( $P_1$  e  $P_2$ ).

No segundo grupo, a catálise resulta de um efeito “microsolvente” das microcavidades heterogêneas dentro da ciclodextrina. Não existe o intermediário  $P_1 - CD$ , mas todos os outros passos da reação são análogos. Como o substrato reage para formar o complexo de inclusão (CD.S), a reação deve, assintoticamente, se aproximar de um valor limite com o aumento da ciclodextrina. A inibição também pode ocorrer com a adição de uma molécula inerte, que possa competir com o substrato para ocupar a cavidade da ciclodextrina. A hidrólise de fenil-ésteres por ciclodextrina foi estudada detalhadamente por Van Etten et al. (1967), conforme citação de SABIONI (1991). GRIFFITHS & BENDER (1987) publicaram uma revisão de literatura tratando as ciclodextrinas como catalisadores.

#### 2.5.4 ENZIMA CICLODEXTRINA GLICOSIL TRANSFERASE (CGTase)

Uma das propriedades mais importantes das CD é sua resistência à hidrólise por parte das enzimas do grupo amilolítico ( $\alpha$  e  $\beta$ -amilase, amiloglicosidase e pululanase). As CD naturais são resistentes à ação da enzima  $\beta$ -amilase desde que não apresentem grupos terminais suscetíveis ao ataque dessa enzima. Embora a baixas velocidades, a enzima  $\alpha$ -amilase é capaz de hidrolisar as CD, uma vez que estas enzimas não requerem grupos terminais livres para sua atuação. A enzima amiloglicosidase também não é capaz de hidrolisar as CD. Com algumas exceções as CD não podem ser fermentadas e não são utilizadas pelas leveduras (SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991).

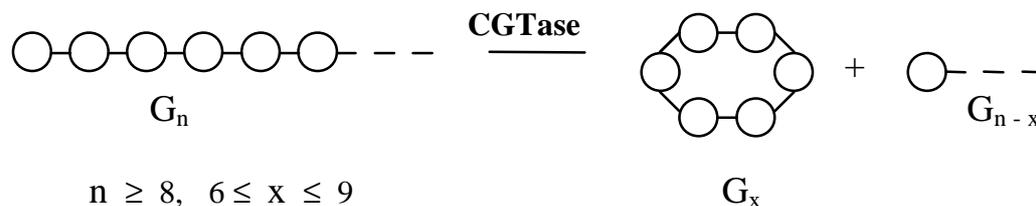
A enzima ciclodextrina glicosil transferase (CGTase) EC 2.4.1.19 ( $\alpha$ -1,4 - glucano - 4 - glicosiltransferase) é uma enzima monomérica, com um peso molecular da ordem de 74,5 kD e que apresenta uma sequência de aminoácidos que revela uma similaridade estrutural com a enzima  $\alpha$ -amilase, sendo por isso considerada uma enzima da família das amilases (KLEIN et al., 1992; VETTER & THORN, 1992; NAKAMURA et al., 1994). Esta enzima catalisa a conversão do amido e outras  $\alpha$ -1,4 - glucanas formando ciclodextrinas por meio de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular (ciclização). Exibem ainda atividade em reações de transglicosilação intermolecular (acoplamento e desproporcionamento), e em menor intensidade em reações de hidrólise do amido (VETTER & THORN, 1992).

O mecanismo exato de atuação da CGTase sobre a molécula de amido, embora muito estudado, ainda não está perfeitamente elucidado. Sendo que um esquema simplificado é mostrado na Figura 2.10 (SICARD & SANIEZ, 1987; SZEJTLI, 1988; COTTAZ & DRIGUES, 1991; ROBYT, 1991).

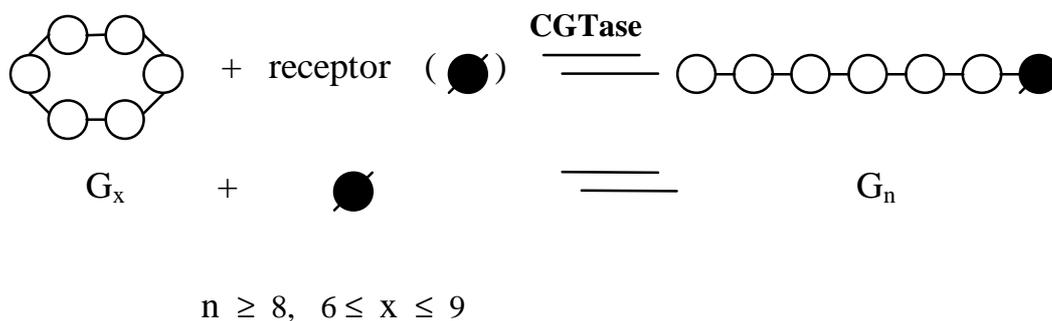
As ciclodextrinas são produzidas a partir da reação de ciclização ou transglicosilação intramolecular, e neste caso o substrato deve conter acima de seis unidades de glicose, e ainda estar na sua forma helicoidal. Nesta reação a extremidade não redutora atua como receptor para extremidade redutora (BENDER, 1986). Pode-se considerar que a reação de ciclização é um caso especial da reação de desproporcionamento. Se o substrato tiver peso molecular inferior a seis unidades de glicose e superior a maltose, a enzima CGTase é capaz de sintetizar oligômeros de maior peso molecular até maior que seis unidades de glicose através das reações de desproporcionamento e daí, produzir ciclodextrinas (MÄKELÄ & KORPELA, 1988).

A especificidade da CGTase para a reação de transglicosilação intramolecular (ciclização) está bem discutida na literatura, e foi verificado que a proporção de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD produzidas é fortemente dependente da origem da CGTase (KITAHATA et al., 1992).

. **Ciclização** (reação de transglicosilação intramolecular).



. **Acoplamento** (transglicosilação intermolecular)



. **Desproporcionamento** (transglicosilação intermolecular)

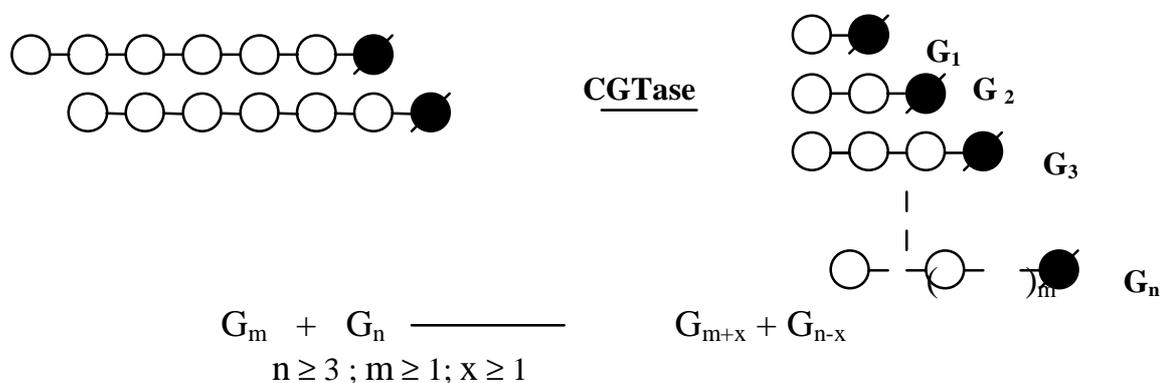


FIGURA 2.10 Esquema de reações proposto para ação da CGTase. (O,G) oligossacarídeo; (m,n) unidades de glicose; (x) unidades de glicose transferidas, (●) unidades de glucopiranosse redutoras.

A reação de acoplamento (coupling) consiste na abertura do anel da ciclodextrina com transferência dos malto-oligossacarídeos produzidos para moléculas receptoras. Esta ocorre na presença de ciclodextrinas e certos co-substratos, existindo uma certa competição entre esta reação e aquela de ciclização. Cineticamente pode ser tratada como uma reação de dois substratos com mecanismo tipo “ping-pong” (BENDER, 1985; KLEIN et al., 1992; NAKAMURA et al., 1994).

Os receptores para reações intermoleculares catalisadas pelas CGTases de *Bacillus megaterium* e *B. macerans* foram estudados por Kitahata e colaboradores, que utilizaram diversos monossacarídeos e álcoois derivados do açúcar. Estes pesquisadores concluíram que para ser um receptor apropriado este deve ter a estrutura de piranose com os mesmos grupos hidroxilas livres nos carbonos C2, C3 e C4, da glicose. Observaram que para CGTase de *B. megaterium* os mais eficientes foram na ordem: maltose, glicose, maltotriose e sacarose, enquanto para a enzima do *B. macerans*, a ordem foi: glicose, maltose, sacarose e maltotriose. Ao realizarem estudos com CGTase de *B. stearothermophilus*, observaram que a glicose e a sacarose foram o melhores receptores seguidos pela maltose e maltotriose (SABIONI, 1991).

Em estudos posteriores realizados pelo grupo de Kitahata, estes concluíram que a CGTase catalisa a reação de transglicosilação intermolecular quando está na presença de receptores apropriados, sendo que na ausência dos mesmos ou na presença dos receptores “pobres” a reação ocorre no sentido da transglicosilação intramolecular (ciclização), produzindo principalmente ciclodextrinas. Observaram que se uma alta atividade enzimática é incubada por longo tempo na presença de amido, contendo receptores pobres, as CD produzidas no estágio inicial da reação podem atuar como substratos doadores para as reações de acoplamento e os produtos oriundos dessas reações se acumulam no meio (KITAHATA et al., 1992).

A reação de transglicosilação intermolecular de desproporcionamento (homologizing ou disproportionation) que consiste na redistribuição de resíduos de glicose entre os malto-oligossacarídeos, foi evidenciada por Norberg & French, quando observaram que dextrinas lineares na presença da amilase de *B. macerans* eram capazes de reagir entre si mostrando uma redistribuição das unidades de glicose (SABIONI, 1991).

O estudo do mecanismo das reações de ciclização e desproporcionamento, requer que o substrato seja bem caracterizado quanto ao seu grau de polimerização, isto é, tamanho da cadeia.

BENDER (1985) realizou pesquisas objetivando determinar o efeito de inibição dos malto-oligossacarídeos na produção de ciclodextrinas a partir de glicogênio com CGTase de *Klebsiella pneumoniae*, e observou que: (i) a glicose atuava como um receptor para as reações de desproporcionamento; (ii) a maltose mostrou-se ser um inibidor competitivo na fase inicial da reação de ciclização; (iii) a maltotriose, até a maltoheptose também apresentaram-se como inibidores para a reação de ciclização; e (iv) o grau de inibição aumentou da maltose para maltotetraose e diminuiu para os oligossacarídeos superiores.

VILLETE et al. (1990), realizaram pesquisas visando estudar a cinética da reação da CGTase de *B. circulans*, e para tanto utilizaram vários substratos (amido de waxy milho, amido de trigo, milho, batata, glicogênio, maltoheptose, maltose, glicose entre outros), e inibidores (glicose, celobiose, maltose, sacarose entre outros). Confirmaram a existência de dois sítios na enzima, um que age como doador e outro como receptor, cujas características auxiliam na compreensão da especificidade da enzima bem como na interconversão das ciclodextrinas depois da fase inicial da reação. Comprovaram que o sítio receptor apresentava uma grande afinidade para as moléculas com estrutura análoga às moléculas de amido não-redutoras mostrando os seguintes

porcentuais de inibição à reação de ciclização: glicose - 35%; celobiose - 85%; maltose - 87% e sacarose 0%; e ainda, a maltose era um bom receptor para as reações de transglicosilação, seguido da glicose e sacarose. Também observaram que na ausência de receptores a CGTase não realiza as reações de acoplamento, ou seja, não conseguiam destruir as ciclodextrinas, porém a presença de traços de oligossacarídeos ou vários receptores adicionados ao meio reacional de produção de CD, eram suficientes para desencadear o processo de transglicosilação intermolecular. Notaram ainda que, substratos com baixa dextrose equivalente (pequeno grau de hidrólise) favorecem a produção de  $\beta$ -ciclodextrina. Porém, quando o substrato apresentava maior valor de D.E. ( $\cong 12$ ), existia a possibilidade de formação de complexos enzima - substratos improdutivos para a reação de ciclização, porém capazes de realizar as reações de acoplamento, onde a  $\beta$ -CD era destruída. Isto pode ser uma explicação para o fato de que, para obtenção de altos rendimentos em  $\beta$ -CD, é necessário conduzir o processo na ausência de enzima  $\alpha$ -amilase ativa e na presença de agentes complexantes da  $\beta$ -CD (solventes).

Pesquisas realizadas por VETTER & THORN (1992) também demonstraram que a reação de desproporcionamento era mais rápida em oligossacarídeos com grau de polimerização superior a nove, bem como que na presença de  $\alpha$ -CD os grupos maltohexaosil eram altamente acoplados à maltose, sendo que o produto, malto-octaose aparecia no meio com um rendimento molar de 45%.

As reações de acoplamento e desproporcionamento tem sido utilizadas para a produção de oligossacarídeos lineares, com a finalidade de elucidar mecanismo de reações enzimáticas envolvendo as amilases, bem como substitutos da sacarose em alimentos, confeitos e bebidas visando a redução da cárie dentária. Nesse caso, a reação de desproporcionamento e acoplamento é conduzida na presença da sacarose (PAZUR, 1991)

O primeiro microorganismo descrito na literatura como produtor de CGTase foi o *Bacillus amilobacter*, com o qual Villiers, em 1891, produziu as primeiras dextrinas de Schardinger (FRENCH, 1957). Em 1903 Schardinger reportou ser o *Bacillus macerans* um bom produtor de CGTases. Este é o microorganismo mais amplamente estudado e utilizado para a produção industrial de CD (SZEJTLI, 1988; JAMUNA et al., 1993).

Desde a descoberta da CGTase no meio de cultura de *B. macerans* a produção desta enzima tem sido estudada em diversas linhagens de bactérias, tais como: *B. macerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *B. megaterium* e *B. stearothermophilus*. As enzimas obtidas a partir desses microorganismos apresentam diferentes propriedades como estabilidade térmica, pH ótimo e capacidade de formação de CD (HORIKOSHI, 1988).

A grande maioria das CGTases isoladas até o presente produzem, preferencialmente,  $\alpha$  /  $\beta$ -CD com traços de  $\gamma$ -CD (JAMUNA et al., 1993).

A CGTase isolada de *B. macerans* tem a capacidade de produzir  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD nas proporções de 2,7 : 1 : 1 respectivamente, enquanto a CGTase de *B. megaterium* produz as seguintes proporções de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD, respectivamente, 1 : 2,4 : 1 (HORIKOSHI, 1988).

Na literatura são citadas mais de 15 espécies de bactérias que produzem a CGTase e todas podem ser classificadas em dois grupos: (i)  $\alpha$ -CGTase que é principalmente produtora de  $\alpha$ -CD nos instantes iniciais da reação, e dentre essas destaca-se a CGTase extracelular isolada do *B. macerans*, e (ii)  $\beta$ -CGTase cuja ação direciona-se inicialmente para formação da  $\beta$ -CD (ENGLBRECHT et al., 1990).

Todas essas enzimas apresentam a desvantagem de baixa estabilidade térmica o que é um fator limitante do ponto de vista industrial, além de apresentarem um rendimento abaixo de 55% (HORIKOSHI, 1988). Isto fez com que as pesquisas se direcionassem para a busca de uma CGTase mais termoestável e com maior rendimento na produção de CD. Nesse sentido HORIKOSHI (1971, 1988) iniciou uma pesquisa sobre a produção de enzimas a partir de microorganismos alcalofílicos isolados do solo que cresceram bem em meio alcalino. Uma dessas bactérias alcalofílicas produziu preferencialmente  $\beta$ -CD em quantidades superiores às demais CGTases citadas na literatura. A CGTase produzida por este microorganismo foi estudada em uma série de trabalhos, e é considerada a melhor linhagem produtora de CGTase. Recentemente SABIONI & PARK (1992) isolaram uma bactéria que produziu uma CGTase extracelular, que foi identificada como *Bacillus lentus* e mostrou ser uma  $\beta$ -CGTase, pois em 24 horas de reação produziu  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD na seguinte proporção: 1 : 67 : 1,6.

Uma linhagem de *Bacillus subtilis*, que produziu somente  $\gamma$ -CD foi estudada por KATO & HORIKOSHI (1986). Desde então as pesquisas tem sido conduzidas no sentido de buscar uma enzima com especificidade para a produção de  $\gamma$ -CD, ou seja, uma  $\gamma$ -CGTase. Isto inclusive usando técnicas de engenharia genética (HORIKOSHI, 1988; MATTSSON et al., 1988; ENGLBRECHT et al., 1990; HAMACKER & TAO, 1993; PATRICK LEE & TAO, 1994).

A atividade da enzima CGTase pode ser determinada por diversos métodos analíticos, mas devido a presença de outras enzimas (pululanase ou  $\alpha$ -amilase) nos meios de fermentação onde são produzidas as CGTases, não é muito fácil determinar sua atividade. Um método específico confiável e de rotina ainda não está disponível. A determinação da atividade da enzima CGTase pode ser baseada na formação da CD ou no consumo do amido (SICARD & SANIEZ, 1987; SZEJTLI, 1988).

O primeiro método desenvolvido por Tilden & Hudson em 1942, é mais qualitativo do que quantitativo e baseia-se na formação de CD, principalmente quando a linhagem de bactérias produzem a  $\alpha$  e  $\beta$ -CD. Consiste na visualização microscópica dos cristais do complexo CD-iodo (SICARD & SANIEZ, 1987; SZEJTLI, 1988).

Posteriormente foram desenvolvidos diversos métodos baseados no decréscimo da intensidade da cor do complexo iodo-amido e, neste caso, o método fundamenta-se na avaliação do consumo de substrato. A desvantagem dessa técnica é que só pode ser aplicada quando se trabalha com CGTase pura, pois a presença de enzimas hidrolíticas pode diminuir a intensidade da cor do complexo iodo-amido (SZEJTLI, 1988).

Como as CD tem habilidade de formar compostos de inclusão molecular (aprisionamento de outras moléculas externas no interior da cavidade) esta propriedade pode ser utilizada para a determinação da atividade da enzima CGTase.

A  $\alpha$ -CD forma um complexo incolor com o metil orange, portanto seguindo a extinção da absorvância da solução na qual a  $\alpha$ -CD é sintetizada pela CGTase pode-se determinar sua atividade acompanhando-se a formação de produto (SZEJTLI, 1988).

A  $\beta$ -CD forma um complexo incolor estável com a fenolftaleína, portanto o decréscimo na intensidade da cor da solução contendo fenolftaleína é proporcional à concentração de  $\beta$ -CD (SICARD & SANIEZ, 1987; HAMON & MORAES, 1990).

Para o caso da  $\gamma$ -CD a atividade da enzima é determinada com uma solução de verde de bromocresol e, neste caso acompanha-se o acréscimo da absorvância da solução a 620 nm (HAMON & MORAES, 1990).

Um método enzimático e eficiente, porém bastante tedioso e, que produz resultados quantitativos baseia-se na hidrólise total da solução de amido com enzima amiloglicosidase, após a reação com CGTase. A solução padrão é uma solução de amido que foi hidrolisada pela enzima amiloglicosidase, porém na ausência da CGTase. A quantidade de CD produzida é calculada pela diferença entre o valor da solução padrão e o valor do ensaio (SICARD & SANIEZ, 1987).

A determinação das CD produzidas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) é bastante rápida e quantitativa, mas existe a necessidade de se dispor de colunas específicas para a dosagem das diferentes formas de CD.

HAMON & MORAES (1990) desenvolveram métodos colorimétricos para a determinação da atividade da enzima CGTase, baseando-se no princípio da inclusão molecular. Dessa forma a  $\beta$ -CD é determinada com fenolftaleína e a  $\gamma$ -CD com verde de bromocresol.

### 2.5.5 PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas são formadas pela ação da enzima ciclodextrina glicosil transferase (CGTase) em um meio contendo amido. Devido a estrutura helicoidal das moléculas de amido, o produto primário da clivagem pela enzima CGTase sofre uma reação intramolecular e são formados produtos cíclicos de ligação  $\alpha$ -1,4 que conduz a uma mistura de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD, juntamente com uma série de dextrinas acíclicas (SZEJTLI, 1988). A proporção de cada ciclodextrina formada depende de vários fatores, dentre eles pode-se citar: o tempo de reação, a linhagem do microorganismo, condições de reação (pH, temperatura, etc.) e adição de agentes complexantes. Diversos solventes e surfactantes foram testados como: acetona, glicerol, propanol, tolueno, etanol, entre outros (LEE & KIM, 1991; TOMITA et al., 1993).

A preparação das ciclodextrinas pode ser dividida nas seguintes fases (SZEJTLI, 1988):

- (i) - cultivo do microorganismo produtor de CGTase;
- (ii) - separação da enzima a partir do meio de cultura, sua concentração e purificação;
- (iii)- conversão enzimática do amido pré-hidrolisado ou natural para uma mistura de dextrinas cíclicas (CD) e não-cíclicas;
- (iv)- separação das CD a partir da mistura de conversão, purificação e cristalização.

Com o aumento da concentração de amido, há no meio reacional, uma maior concentração de espécies inibidoras da reação de ciclização, como por exemplo as dextrinas de baixo peso molecular e as próprias CDs, com isso há uma redução da seletividade com relação à produção de ciclodextrinas.

A literatura sobre a preparação das CD é bastante vasta, compreendendo muitos trabalhos e patentes, sendo que há disponibilidade de processos mais específicos para a produção das formas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD. Na Tabela 2.2 apresenta-se alguns métodos de produção de ciclodextrinas (SZEJTLI, 1988).

TABELA 2.2 Métodos e principais Patentes para a produção de ciclodextrina (BENDER, 1986; SZEJTLI, 1988).

Patente	Concentração de amido	Pré-hidrólise	Agente Complexante	Forma da CD e recuperação	Produto majoritário
Armbruster & Kooi, 1969	batata, 30%	amilase	tolueno	hidrólise do amido restante e evaporação, do tolueno, $\beta$ -CD	$\beta$ -CD
<sup>1</sup> Hitaka et al., 1971	batata, 5%		resina aniônica	adsorção; eluição com NaOH ou KCl	mistura
<sup>2</sup> Armbruster, 1970		amilase		mistura contendo 45% $\alpha$ -CD e 55% $\beta$ -CD, por ciclohexano	$\beta$ -CD
<sup>2</sup> Armbruster & Jacaway, 1972	batata, 30%	$\alpha$ -amilase	1-decanol, 1-butanol	$\alpha$ -CD, complexo com tri-cloroetileno	$\beta$ -CD
<sup>2</sup> Okada & Tsuyama, 1973	10% ou mais de amido solúvel ou milho		tri-cloroetileno	ppt com bromobenzeno	$\beta$ -CD
<sup>1</sup> Sato et al., 1974	5 - 30 %	amilase ou ácido oxálico	tricloroetileno		mistura
<sup>1</sup> Horikoshi et al., 1974	batata, 10%	NaOH		ppt com $\text{CHCl}_3$	mistura
<sup>1</sup> Horikoshi & Nakamura, 1979	batata, 4%	CGTase		glucoamilase	
<sup>2</sup> Yagi & Kouno, 1980			tri-cloroetileno	$\beta$ -CD em complexo com tricloroetileno	$\beta$ -CD
<sup>2</sup> Horikoshi et al., 1981	4%	temperatura (125°C, 30min.)		CD adsorvida por coluna de resina	mistura
Flashel et al., 1982	batata, 10%		decanol		$\alpha$ -CD
Hokse et al., 1984	40%	“jet cooker” e $\alpha$ -amilase		ultrafiltração e reciclagem do amido	mistura
<sup>2</sup> Seres, 1985	40% ou mais	$\alpha$ -amilase	cetonas alifáticas	mistura 1/1 de naftol e metilcetona	$\alpha$ e $\gamma$ -CD
<sup>2</sup> Ammeral, 1988	35% ou mais	trans-glicosidase	limoneno	$\beta$ - e $\gamma$ -CD	

1- citados por SZEJTLI (1988)

2- citados por BENDER (1986)

Uma revisão das principais Patentes de produção de CD foi realizada por SZEJTLI (1988), sendo algumas conclusões apresentadas a seguir:

1. altas concentrações de substrato (amido) resultam em menores custos operacionais, porém o rendimento em CD diminui. Uma concentração ótima de amido (aproximadamente 30% p/v) representa um compromisso a ser atingido. Este efeito será comentado no item 2.5.7;

2. quando se trabalha com altas concentrações de amido é necessário reduzir a viscosidade da solução por meio de uma pré-hidrólise parcial, por exemplo com ácidos ou com enzima  $\alpha$ -amilase, ou ainda com uma pequena quantidade de CGTase. Ainda podem ser utilizados métodos mecânicos de moagem (KIM et al., 1993);
3. a enzima CGTase produz as três formas de CD ( $\alpha$ ,  $\beta$  e/ou  $\gamma$ ). A proporção de cada uma depende do tempo de reação, da linhagem do microorganismo e das condições de reação (pH, temperatura, etc.), bem como da adição de agentes complexantes (solventes). Diversos solventes e surfactantes foram testados como: acetona, etanol, glicerol, propanol, tolueno, Triton-X, entre outros, (LEE & KIM, 1991; TOMITA et al., 1993). Um estudo demonstrou que o rendimento em  $\beta$ -CD aumentou 2,4 vezes quando se adicionou 15% de etanol em uma solução a 30% p/v de amido, com uma CGTase de *Bacillus circulans* var *alkalophilus* (MATTSSON et al., 1991). Este efeito será comentado no item 2.5.8;
4. na ausência de complexantes orgânicos produz-se uma mistura de CD, e o rendimento em CD cristalina cai a níveis inferiores a 20% em condições industriais típicas, isto é, na presença de altas concentrações de amido. Além disso há a formação de diversos produtos secundários que contêm as CD acíclicas (não cristalizáveis);
5. a produção de uma mistura de CD não é econômica do ponto de vista industrial, devido aos altos custos de separação e purificação do produto;
6. condições econômicas para se produzir, preferencialmente, uma dada forma de CD só é possível quando se utiliza complexantes orgânicos e microorganismos com CGTase que apresentem uma certa especificidade para  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ -CD;
7. quando se utiliza complexantes orgânicos para melhorar o rendimento em CD necessário se empregar métodos de análise do produto bastante sensíveis uma vez que, às vezes, a legislação não permite a presença de solvente no produto em quantidades superiores a ppm ou ppb;
8. a utilização de enzimas desramificadoras (pululanase) aumenta o rendimento em CD pois as ligações  $\alpha$ -1,6 da amilopectina atuam como inibidores da CGTase, sendo que nesse caso, de um modo geral, a taxa de produção de CD aumenta em cerca de 4 a 6%;
9. a quantidade de glicose e maltose presentes no meio reacional não podem ser superiores a 5% do amido, e neste caso o rendimento em CD está entre 30 e 70%. Quando a quantidade de glicose e maltose ultrapassa 20% de amido, o rendimento em CD cai a valores próximos a 15%.

Até o presente não se conhece uma CGTase específica para produção de  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ -CD. Sabe-se que *B. macerans* e *K. pneumoniae* produzem, preferencialmente  $\alpha$ -CD, enquanto bactérias alcalofílicas produzem, preferencialmente,  $\beta$ -CD no início da reação (SZEJTLI, 1988). Uma linhagem de *K. oxytoca* 19-1 produziu CD na proporção de 96,5 : 3,5 : 0, respectivamente para  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD (LEE et al., 1992). Uma linhagem de *B. autolyticus* 11149 foi bastante seletiva para  $\beta$ -CD, produzindo traços de  $\alpha$  e  $\gamma$ -CD (TOMITA et al., 1993).

A produção econômica de  $\alpha$ -CD deve ser realizada por um processo de conversão controlada com a utilização de um agente complexante apropriado, como por exemplo, ácido butírico e decanol (SZEJTLI, 1988).

A  $\gamma$ -CD atualmente é produzida por dois processos: (i) conversão não controlada a partir do meio reacional da produção de  $\beta$ -CD que contém aproximadamente 8% de  $\gamma$ , 7% de  $\beta$  e 3% de  $\alpha$ -CD. A  $\gamma$ -CD é cristalizada pela concentração da solução após tratamento em coluna de troca-iônica e gel. Partindo-se de 750 kg de sólidos totais, produz-se, aproximadamente, 14 kg de  $\gamma$ -CD; (ii) em processo de conversão controlada, e nesse caso utiliza-se agentes complexantes específicos para  $\gamma$ -CD (metil-cetona mais naftol), que formam um complexo insolúvel e estável com essa CD. A fração insolúvel é separada por filtração e o naftol é extraído com metanol. Após tratamento da solução com colunas de troca-iônica e carvão a solução é submetida à concentração por evaporação para finalmente se obter a  $\gamma$ -CD na forma cristalina. Em base amido, o rendimento é da ordem de 20% (SZEJTLI, 1988).

## 2.5.6 PRODUÇÃO DE $\beta$ -CICLODEXTRINA

Na produção específica de  $\beta$ -CD, o processo mais clássico utilizado, é o da conversão controlada que envolve a presença de solventes orgânicos - tolueno (utilizado na Hungria). A principal vantagem deste método é que o solvente tem habilidade de mudar o equilíbrio da reação enzimática em relação à formação dos compostos. Este processo proporciona um rendimento final em torno de 33%. A separação da  $\beta$ -CD do meio reacional é feita por precipitação, o que só é possível devido sua baixa solubilidade em meio aquoso (SICARD & SANIEZ, 1987; SZEJTLI, 1988).

O método de conversão não controlada (sem agentes complexantes) também é utilizado na produção de  $\beta$ -CD, porém em menor proporção em função dos baixos rendimentos (utilizado no Japão). Este método proporciona um rendimento máximo de 25% (SICARD & SANIEZ, 1987). A seguir são mostrados dois exemplos de produção de  $\beta$ -CD na presença ou na ausência de solventes.

### 2.5.6.1 Processo de produção por solventes

Um processo típico envolve a reação do amido liquefeito com extrato bruto de CGTase ou enzima purificada para obter soluções hidrolisadas contendo  $\beta$ -ciclodextrinas.

A etapa da hidrólise é seguida pela adição de um solvente orgânico, tais como: tricloroetileno, tetracloretoano, tolueno, entre outros, a fim de precipitar as ciclodextrinas como um composto, possibilitando a separação do amido hidrolisado. O solvente é eliminado posteriormente por destilação a vapor. É possível alcançar baixa concentração do solvente no produto final, chegando até menos que 1 ppm. A Figura 2.11 apresenta as etapas para obtenção de ciclodextrina utilizando como agente complexante o tricloroetileno (SICARD & SANIEZ, 1987).

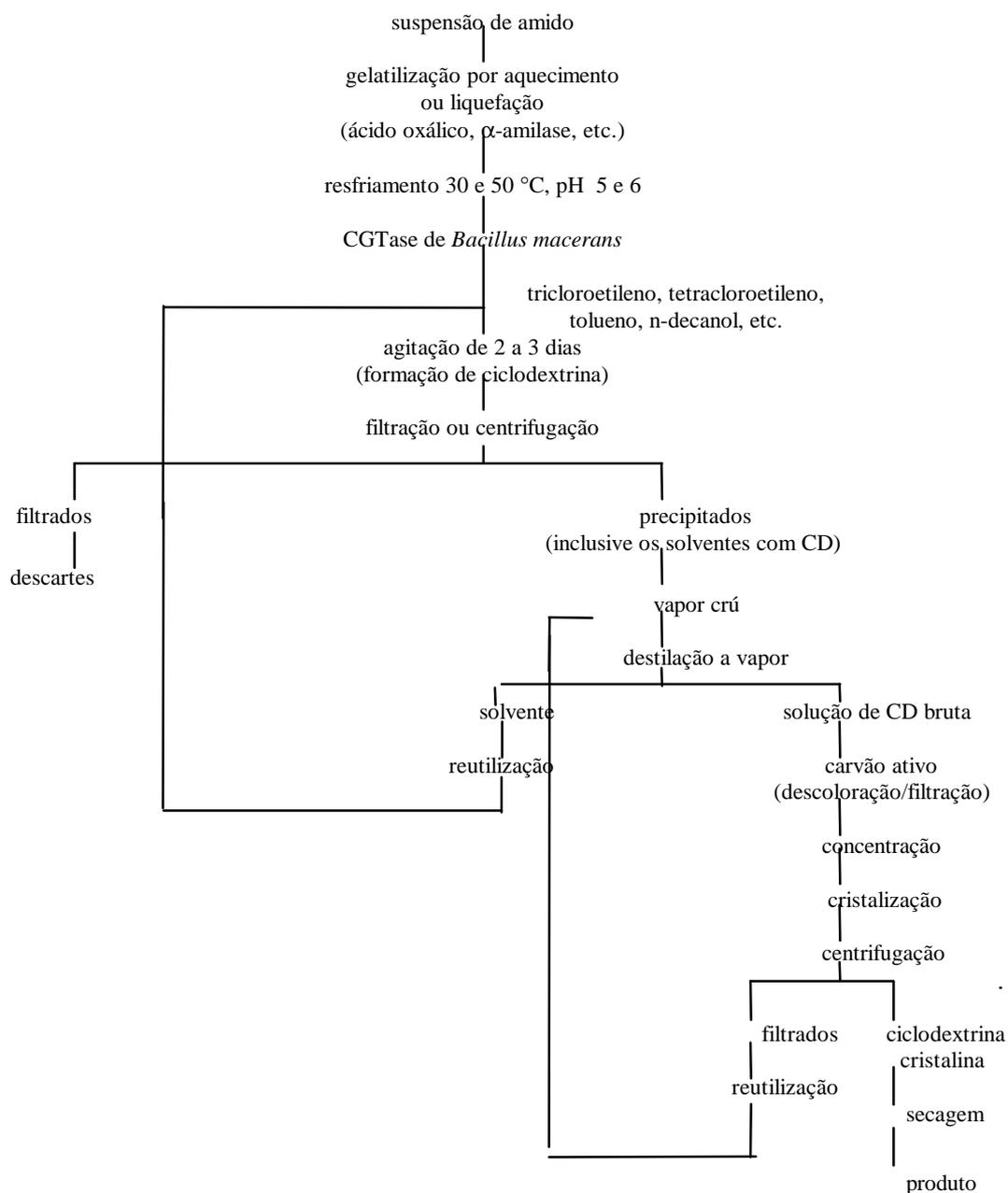


FIGURA 2.11 Processo de produção de CD por tricloroetileno (SICARD & SANIEZ, 1987).

### 2.5.6.2 Processo de produção sem solventes

Este processo consiste na reação do amido liquefeito com uma CGTase em pH alcalino. Além da CGTase, adiciona-se à mistura uma pequena quantidade de CD como semente de cristal para auxiliar a precipitação. A eficiência é cerca de 25 % na produção final, considerado baixo quando comparado aos processos com solventes. A Figura 2.12 mostra as etapas de produção na ausência dos solventes complexantes. Neste processo utiliza-se uma CGTase originária de *Bacillus alkalophilic* (SICARD & SANIEZ, 1987).

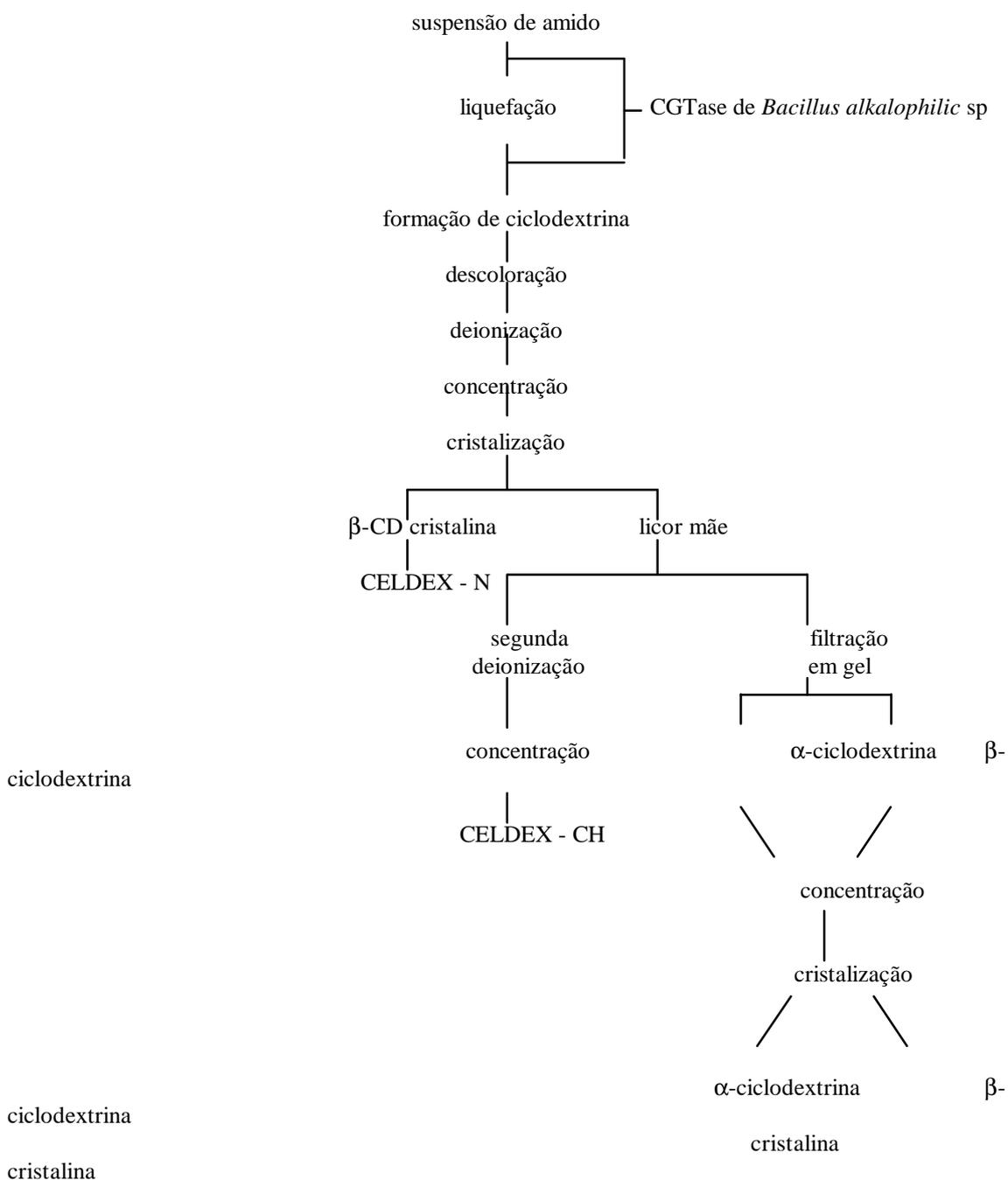


FIGURA 2.12 Processo de produção de ciclodextrina sem solvente com CGTase de pH alcalino (SICARD & SANIEZ, 1987).

De um modo geral, os processos disponíveis para produção de  $\beta$ -CD envolvem variações dos dois processos descritos. Uma forma de se minimizar os efeitos de inibição pelos produtos da reação, sem adição de solvente, é empregar membranas de ultrafiltração com diâmetro de corte apropriado para a permeação das ciclodextrinas, retendo-se dessa forma a CGTase ativa e os demais produtos da degradação do amido, podendo-se, assim, aumentar o rendimento em CD (HOKSE et al., 1984; SICARD & SANIEZ, 1987; KIM et al., 1993).

As separação das CDs do licor mãe, no processo sem solvente, pode ser conduzido empregando-se resinas catiônicas, resinas aniônicas entre outras (SICARD & SANIEZ, 1987).

A separação da  $\beta$ -CD do meio reacional também pode ser realizada pela adição da enzima amiloglicosidase que converte as dextrinas lineares em glicose. Nesse processo uma parte da  $\beta$ -CD produzida é cristalizada, enquanto outra permanece em solução juntamente com a  $\alpha$  e  $\gamma$ -CD que são mais solúveis, sendo posteriormente separadas por adsorção em resinas de troca iônica. Dessa forma evita-se a presença de solventes (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

O processo de conversão controlada, pode ser utilizado para a produção de uma determinada ciclodextrina com alto rendimento e relativamente baixo custo de produção. Pode-se melhorar a produção de  $\beta$ -CD conduzindo-se a reação enzimática na presença de tolueno, em temperatura, pH e tempo de reação adequados. A  $\beta$ -CD forma um complexo insolúvel com o tolueno, que pode ser removido continuamente do meio reacional. De forma semelhante, a adição de decanol aumenta a produção de  $\alpha$ -CD, enquanto maior rendimento em  $\gamma$ -CD é conseguido na presença de  $\alpha$ -naftol e metil-etil-cetona. Um processo adequado deve reunir as qualidades de alto rendimento e alta pureza com baixos custos de produção, o que ainda não foi plenamente conseguido (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

As ciclodextrinas produzidas industrialmente são utilizadas, principalmente, nas indústrias farmacêuticas e alimentícias, sendo portanto, os critérios de pureza muito rígidos. A solução aquosa a 1% em CD deve ser límpida e ter pH próximo ao neutro. A presença de solventes deve ser, em alguns casos inferior a 1 ppb. A contagem de microorganismos contaminantes deve indicar uma contagem de germes inferior a 1 000/g; esporos de fungos menor que 100/g e ausência total de microorganismos patogênicos (SZEJTLI, 1988).

No futuro, a  $\beta$ -CD preferida para as aplicações em fármacos e alimentos será aquela que não conterà quantidades detectáveis de solventes orgânicos, ou porque foram produzidas por tecnologias que não empregaram solventes (solvent-free), ou pelo fato destes terem sido removidos com altíssima eficiência (FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

### 2.5.7 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS

Nos processos industriais, de um modo geral, tem se buscado utilizar soluções de substrato concentradas, de modo a reduzir os custos operacionais do processo, nas etapas de separação e recuperação do produto desejado. Para o caso da produção de ciclodextrinas onde, de forma geral, a matéria-prima apresenta um custo relativamente baixo, esta seria a situação desejada, porém a inibição da CGTase pelo substrato, e as reações de transglicosilação intermolecular que podem ocorrer em meios mais concentrados, demonstram que há um compromisso entre a concentração da solução de substrato inicial e o rendimento em ciclodextrinas.

ARMBRUSTER & KOOI (1969) patentearam um processo para a produção de ciclodextrinas, a partir de amido de “waxy maize” a 30% p/v previamente hidrolisado com enzima  $\alpha$ -amilase, e apresentando uma dextrose equivalente (D.E.) de 0,4 a 25,5. Observaram que rendimentos em ciclodextrinas superiores a 40% eram obtidos quando utilizavam uma D.E. entre 0,4 e 6,0, o que representava 18,4 gCD/100 mL e 14,0 gCD/100 mL, respectivamente para D.E. 0,4 e 6,0. Para D.E. 25,5 obtiveram 0,7 gCD/100 mL o que representou um rendimento de apenas 2%.

O efeito da concentração de substrato e da dextrose equivalente (D.E.) sobre a formação de ciclodextrinas foi estudado por HORIKOSHI et al. (1982), utilizando uma CGTase de *Bacillus alkalophilic* nº 38-2. Em seus experimentos prepararam soluções de amido de batata, com aproximadamente 1 a 30% p/v de substância seca, hidrolisada com a própria CGTase a 85°C e pH 8,5 por 30 min até uma D.E. aproximadamente igual a 2; pois já haviam observado que ao aumentar a D.E. da solução ocorria uma redução na produção de CD, sendo mais acentuada para a  $\beta$ -CD (produção de 25% para D.E.  $\cong$  1,0 reduzia para aproximadamente 10% com D.E.  $\cong$  10). Notaram que o rendimento na produção de  $\beta$ -CD aumentava de aproximadamente 40% (da ordem de 10 para 50%) quando utilizaram respectivamente, 25% e 2% p/v de solução de substrato.

Segundo processo patenteado por HOKSE et al. (1984), a produção de  $\beta$ -CD a partir de amido solúvel com concentração de 1 a 10% p/v, em 44 horas de reação e utilizando uma enzima CGTase de *Bacillus circulans* RIV nº 11115, observaram que rendimentos em CD total de 60% consistindo de 66% de  $\beta$ -CD eram obtidos quando utilizaram uma solução de amido a 1% e uma razão de enzima/substrato entre 5 e 50 mg enzima/ mL solução de substrato. Notaram ainda que, embora empregando 50 mg de enzima em uma solução de substrato a 10% p/v o rendimento em CD foi da ordem de 30%, como pode-se observar na Tabela 2.3

TABELA 2.3 Produção de CD em função da concentração de amido solúvel, 60°C (5 e 10%) e 50°C (1 e 2%), pH 6,0, 44 horas (HOKSE et al., 1984).

	Concentração de amido (% p/v)	Enzima (mg)	polímeros (%)	Porcentual de CD				Razão
				a	b	g	Total	a:b:g
<b>1</b>	10	10	86,6	1,2	9,9	2,3	13,4	1:8,3:1,9
<b>2</b>	10	25	77,7	2,5	15,7	4,1	22,3	1:6,3:1,6
<b>3</b>	10	50	70,1	2,8	20,4	6,7	29,9	1:7,3:2,4
<b>4</b>	5	5	87,6	1,5	9,1	1,8	12,4	1:6,1:1,2
<b>5</b>	5	10	73,2	2,8	18,9	5,1	26,8	1:6,8:1,8
<b>6</b>	5	25	65,5	3,9	25,1	5,5	34,5	1:6,4:1,4
<b>7</b>	2	5	67,7	3,3	22,8	6,2	32,3	1:6,9:1,9
<b>8</b>	2	10	61,9	4,3	27,9	5,9	38,1	1:6,5:1,4
<b>9</b>	2	15	52,1	6,0	33,5	8,4	47,9	1:5,6:1,4
<b>10</b>	1	5	54,0	6,0	35,0	5,0	46,0	1:5,8:0,8
<b>11</b>	1	10	40,0	8,0	40,0	12,0	60,0	1:5:1,5
<b>12</b>	1	15	39,5	8,0	40,0	12,5	60,5	1:5:1,6

A produção de ciclodextrinas a partir de amido de batata, pré-hidrolisado por um processo de “jet-cooking” a 155°C, pH 6,0 e concentração de substância seca entre 2 e 25%, empregando uma CGTase de *B. circulans* foi investigada por BERGSMAN et al. (1988). Seus resultados demonstraram que, enquanto o porcentual de conversão de amido em  $\beta$ -CD decresceu de 43% (concentração de 2,3% de amido) para 19% (concentração de 22,6% de amido), a produção de  $\beta$ -CD por unidade de volume de reator passou de 9,9 a 43 g/L, respectivamente para 2,3 e 22,6% de amido. Concluíram que em baixa concentração de amido o rendimento era limitado pelas propriedades intrínsecas do substrato, sendo que a cadeia reta da amilose e amilopectina podiam ser transformadas em CD, e ainda, que as regiões helicoidais presentes no substrato eram necessárias à ação da CGTase. Por outro lado, a redução do rendimento à medida em que aumentava a concentração de substrato devia-se à forte e reversível inibição da CGTase pela  $\beta$ -CD e em menor grau a  $\alpha$  e  $\gamma$ -CD.

O comportamento da produção de ciclodextrina pela enzima CGTase do *B. thermoanaerobacter* sp em função da concentração inicial de substrato pode ser observado na Tabela 2.4, onde nota-se que a produção de  $\beta$ -CD decresce de 23,4 % para uma solução com 1% de substância seca até 11,1 para uma solução com 40% de substância seca (STARNES et al., 1990).

TABELA 2.4 Efeito da concentração da solução de amido base seca na produção de ciclodextrina (STARNES et al., 1990).

* D.S (%)	a-CD (%)	b-CD (%)	gCD (%)	TOTAL CD (%)
1	33,9	23,4	12,2	69,5
5	23,5	19,5	9,9	52,9
10	10,8	13,2	6,2	30,2
15	9,6	15,4	6,3	31,3
20	8,1	17,6	5,8	31,5
25	7,2	15,3	5,9	28,4
30	6,7	12,6	4,6	23,9
35	5,0	11,0	4,2	20,2
40	6,9	11,1	4,4	22,4

\* D.S - base seca

KIM et al. (1993), ao estudarem a produção de  $\beta$ -CD a partir de amido de milho em um reator com membranas de ultrafiltração observaram que a conversão diminuía à medida que aumentavam a concentração da solução de amido de 5 para 10%, enquanto a quantidade de  $\beta$ -CD produzida aumentava. Atribuíram o decréscimo no rendimento a altas concentrações de amido, ao fato de que a taxa de filtração diminuiu, e conseqüentemente a concentração de  $\beta$ -CD no reator permaneceu relativamente alta, resultando na redução da taxa de reação devido à forte inibição da CGTase pelo seu produto de reação.

SATO & YAGI (1991) realizaram estudos comparativos sobre o efeito da concentração de substrato na produção de ciclodextrinas empregando enzimas CGTase originárias de *B. ohbensis*, *B. macerans* e *B. circulans*. Empregaram amido solúvel com concentração de 1 a 15% p/p, pH 6,0 e 50°C durante 24 horas. Observaram que em todos os casos houve decréscimo do rendimento da produção de ciclodextrinas à medida que aumentaram a concentração de substrato, sendo que o decréscimo mais significativo ocorreu com a enzima CGTase de *B. macerans*.

Estudos realizados por MORI et al. (1994) demonstraram que a produção de ciclodextrinas, a partir de CGTase de *Brevibacterium* sp n<sup>o</sup> 9605, dependia da origem do amido. Observaram que a enzima produzia  $\gamma$ -CD com rendimentos de 18 a 20% a partir de diversos amidos, amilopectinas e amilose de cadeia-curta. A produção de  $\beta$ -CD foi da ordem de 10 a 15%, enquanto a de  $\alpha$ -CD foi muito baixa. Estes resultados são mostrados na Tabela 2.5.

TABELA 2.5 Produção de ciclodextrinas a partir de várias fontes de amido (MORI et al., 1995).

SUBSTRATO	FORMAÇÃO DE CD (%)			
	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>g</b>	<b>TOTAL</b>
Amido solúvel (Katayama)	1,2	10,5	17,6	29,3
Amido solúvel (Merck)	1,3	11,3	18,9	31,5
Amido de batata	0,9	11,0	19,7	31,6
Amido de batata doce	1,0	12,5	21,1	34,6
Amido de milho	0,8	12,7	20,3	33,8
Amilopectina (batata)	0,9	11,5	19,8	32,2
Amilopectina (milho)	0,9	13,7	20,8	35,4
Glicogênio (ostra)	0,3	8,8	7,5	16,6
Glicogênio (fígado de coelho)	0,3	9,8	10,2	20,3
Pine-Dex # 100 (dextrina DE 2 - 5)	0,8	12,0	16,9	29,7
Pine-Dex # 1 (dextrina DE 7 - 9)	0,6	11,4	12,5	24,5
Pine-Dex # 4 (dextrina DE 18 - 20)	1,1	9,1	6,4	16,6
Amilose cadeia curta (DP 18)	0,9	11,8	19,0	31,7
Amido milho Waxy Lintner's solúvel	1,1	14,7	20,3	36,1
Glicose (G <sub>1</sub> )	0	0	0	0
Maltose (G <sub>2</sub> )	0	0	0	0
Maltotriose (G <sub>3</sub> )	0	0	0	0
Maltotetraose (G <sub>4</sub> )	0	3,4	3,1	6,5
Maltopentose (G <sub>5</sub> )	0,2	8,5	8,1	16,8
Maltohexaose (G <sub>6</sub> )	0,3	8,4	10,6	19,3
Maltoheptaose (G <sub>7</sub> )	0,4	4,7	6,9	12,0

A produção de ciclodextrina usando amido de mandioca é pouco explorada na literatura.

### 2.5.8 EFEITO DOS SOLVENTES ORGÂNICOS NA PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS

De acordo com o apresentado no item 2.5.7, como regra, quando a concentração de amido é aumentada, a produção de ciclodextrina diminui substancialmente. Estudos têm sido realizados no sentido de buscar um aumento na produção de CD, e um dos meios explorados na literatura é o emprego de agentes complexantes, tais como: tolueno, tricloroetileno, decanol, ciclo-octano, benzoato de sódio, etanol entre outros. No entanto, tendo em vista o tipo de aplicação da CD alguns solventes não são permitidos em função do seu efeito tóxico.

Em consequência do aumento do uso das ciclodextrinas na síntese de alimentos, trabalhos recentes tem mostrado uma dedicação maior dos pesquisadores na busca de compostos auxiliares de produção principalmente os menos tóxicos, tais como: limoneno, decanol, etanol, entre outros (LEE & KIM, 1991).

Pesquisas com decanol e limoneno mostraram resultados de produção satisfatórios, porém, segundo alguns autores este tratamento apresenta certas limitações. O método que utiliza o decanol é específico para produção de  $\alpha$ -CD. No caso do limoneno (óleo de casca de mandarin - tipo de laranja), apesar dos resultados promissores, o seu uso em escala industrial parece inviável em função do custo relativamente alto deste aditivo (FLASCHEL et al., 1982). Estes pesquisadores demonstraram que a concentração de  $\alpha$ -CD aumentou com a concentração de decanol, sendo que com amido de batata obtiveram um rendimento de 60%. A CD produzida é separada no final, por filtração.

ARMBRUSTER & KOOI (1969), mostraram que para se aumentar a eficiência do processo de produção de CD era interessante realizar a reação na presença de substâncias precipitantes, que formavam um complexo insolúvel com as CD à medida que estas eram formadas no meio reacional, deslocando desse modo o equilíbrio da reação no sentido da ciclização. Sem a presença do agente complexante obtiveram da ordem de 10% (3,2g CD/100 mL) de ciclodextrina, enquanto na presença de p-cimeno este rendimento foi de 50%, a partir de uma solução de amido de batata a 30% p/p, com D.E. = 1,9. Testaram ainda: tetracloretileno, benzeno, tolueno, naftaleno em eter, tricloroetileno, ciclohexana, hexana, clorofórmio, bromobenzeno, tetracloreto de carbono e antraceno em eter, cujos rendimentos variaram de 23 a 50% (6,3 a 14,8g CD/ 100 mL).

Estudos posteriores realizados por ARMBRUSTER (1988) mostraram que a escolha adequada do solvente pode direcionar a produção de uma forma de CD em detrimento de outra. Nesse sentido tolueno e hexano mostraram-se adequados à formação de  $\beta$ -CD tendo alcançado 16g/100 mL e 14g/100 mL de substrato, respectivamente, enquanto 1-decanol favoreceu a produção de  $\alpha$ -CD (14g/100 mL de substrato).

BERGSMA et al. (1988) utilizaram como agente complexante benzoato de sódio e observaram que para uma solução de amido de batata a 22%, obtiveram 113 mg  $\beta$ -CD/ mL enquanto na ausência do complexante este valor alcançava somente 43 mg  $\beta$ -CD/ mL.

Um aumento significativo na produção de  $\alpha$  e  $\beta$ -CD foi conseguido por STARNES et al. (1990), quando empregaram 1-decanol e ciclo-octano respectivamente.

Estudos realizados por LEE & KIM (1991), comparam os resultados de produção de ciclodextrinas em meios reacionais contendo diversas concentrações de etanol, propanol e acetona. Segundo os pesquisadores, a presença destes solventes, proporciona uma maior produção de ciclodextrinas se comparada à contendo apenas CGTase. No entanto, o máximo de produção foi observado a 10% de etanol, que chegou a 100% do total produzido por CGTase. Os autores observaram também, que na presença de solventes orgânicos imiscíveis em água tais como: tolueno e decanol, a produção aumenta. Porém segundo eles, este aumento foi devido ao fato de que as ciclodextrinas produzidas formam um complexo insolúvel com os solventes. Também observaram que na presença de etanol a  $\beta$ -CD praticamente não é degradada pela

CGTase, porém à atividade da enzima decresce mais rapidamente quando o solvente está presente no meio reacional.

Em trabalho recente, MATTSSON et al. (1991), estudaram a produção de CD utilizando como solventes complexantes etanol e dimetilsufóxido (DMSO). Em uma concentração de amido a 15% p/v a conversão máxima para CD foi alcançada com 15% (v/v) de etanol e 5% com DMSO. O aumento resultante na produção total de CD foi aproximadamente o dobro em ambos os casos. Os pesquisadores, comparando os resultados perceberam comportamento semelhantes, porém, na presença de etanol observaram uma maior formação de  $\beta$ -CD, aumentando de 19% para 46% na concentração ótima de etanol 15% (v/v). Concluíram que a concentração ótima de etanol para produção máxima de CD depende estritamente da concentração inicial de amido.

O etanol tem se mostrado vantajoso pelos seguintes fatores (LEE & KIM, 1991).

- (i) - as ciclodextrinas são utilizadas em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, e o etanol não apresenta restrição quanto à sua toxicidade;
- (ii) - a CGTase além da sua atividade de ciclização (síntese), também apresenta propriedade para decompor as ciclodextrinas. Ciclodextrinas formam facilmente complexo de inclusão com etanol, portanto, as ciclodextrinas são menos decompostas na sua presença o que conduz a um aumento de sua produção;
- (iii)- na presença de etanol, a  $\beta$ -CD dificilmente é degradada pela CGTase.

O etanol não melhora a precipitação dos produtos de conversão sobre a cadeia de concentração empregada, mas facilita a solubilidade. Se o fenômeno está baseado na complexação ou na precipitação, vários solventes deveriam mostrar pelo menos algumas diferenças básicas, o que não parece ser evidente até o presente (MATTSSON et al., 1991).

Segundo MATTSSON et al. (1991), há pelo menos quatro mecanismos pelo qual o etanol poderia proporcionar a conversão enzimática de amido em ciclodextrinas.

- (i) - o etanol afetaria a estrutura e a disponibilidade do amido; por abrir a estrutura complexa do amido gelatinizado;
- (ii) - o etanol diminui a concentração efetiva de produtos cíclicos por precipitação ou complexando-os;
- (iii)- o etanol muda as propriedades conformacionais da própria enzima, ou as moléculas de etanol podem se ligar em determinados pontos do sítio catalítico da enzima inibindo as reações de hidrólise. Isto foi evidenciado pelo fato da afinidade da CGTase pelo amido ter aumentado, nos meios onde adicionaram 10 a 20% etanol, o que poderia ser explicado pela melhora da área superficial do amido, efeitos gerais de solubilidade ou mudanças na constante de Michaelis-Mentem;

(iv)- o etanol modifica as propriedades gerais dos meios de reação.

MATTSSON et al. (1991) propuseram que o aumento da produção de CD pela CGTase na presença de solventes complexantes hidrofílicos poderia resultar de um decréscimo na atividade da água na mistura reacional. Isto reduziria as reações de hidrólise da CGTase.

Pesquisas realizadas por MORI et al. (1995) demonstraram que o rendimento total na produção de CD diminuiu com o aumento da concentração de substrato (amido solúvel) de 5 a 15% p/v. Também estudaram o efeito do etanol na degradação das CD na ausência da glicose como receptor. Observaram que as CD não são decompostas na presença do etanol e ausência da glicose, porém quando a glicose está no meio reacional 13% de  $\alpha$ -CD, 38% de  $\beta$ -CD e 99% da  $\gamma$ -CD foram degradadas. Na ausência de glicose encontraram que a degradação foi apenas 8% para  $\alpha$ -CD, 14% para  $\beta$ -CD e 33% para a  $\gamma$ -CD.

De acordo com estudos prévios e atuais, o etanol parece ser um instrumento potencialmente poderoso na produção de ciclodextrinas. É praticamente um aditivo inofensivo, evaporável, que pode ser prontamente destilado e recuperado. Sua aplicação supera riscos de contaminação microbiana no processo de fabricação. Como outros solventes, a produção de uma única espécie de CD é significativamente aumentada, especialmente em altas concentrações de substratos. A direção da reação com relação a uma espécie facilita os processos de purificação. Embora as taxas de reação de CGTase possam ser levemente diminuídas pela adição de solventes, este obstáculo é compensado pela possibilidade de acelerar a reação pela adição de uma quantidade maior de enzima (LEE & KIM, 1991; LEE et al., 1992).

### 2.5.9 PREPARAÇÃO E PROPRIEDADES DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINAS

A propriedade mais notável das ciclodextrinas é apresentarem uma cavidade hidrofóbica na qual vários tipos de compostos podem ser incluídos; formando assim, os complexos de inclusão. Este processo ocorre sem intervenção de ligações covalentes, quer em solução aquosa, quer em fase sólida.

Vários trabalhos encontrados na literatura têm detalhado a formação do complexo de inclusão (HORIKOSHI, 1979) e (NSKK, 1983) e outras dezenas tem mostrado os meios de preparação do complexo de  $\beta$ -CD. Em todas as citações, percebe-se que é essencial a dissolução da CD e das moléculas hóspedes (SZEJTLI, 1988; FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

Três são os meios de preparar os complexos de inclusão (SZEJTLI, 1988):

(i) - **Líquido-líquido:** Agitar uma solução de ciclodextrinas - fria ou quente, ácida ou alcalina - com a molécula hóspede. Se a molécula for insolúvel em água, deverá ser dissolvida em solvente hidrossolúvel. O complexo cristalino é então filtrado e seco;

(ii) - **Líquido-sólido:** Pode-se misturar a ciclodextrina sólida e a molécula hóspede em um agitador potente. Deve-se adicionar água suficiente para se formar uma pasta, misturar suficientemente para que a CD e a molécula hóspede se dissolvam. Não se deve utilizar solventes, pois não há possibilidade de se estabelecer equilíbrio;

(iii)- **Gás-líquido:** A passagem de vapor por uma solução de  $\beta$ -CD - fria ou quente - complexará muitos solventes ou outros produtos químicos presentes. O complexo obtido poderá ser separado por filtração;

A necessidade mínima para formação de complexo de inclusão é que a molécula hóspede deve se adequar, inteiramente, ou ao menos parcialmente, dentro da cavidade da ciclodextrina. Complexos estáveis não serão formados com moléculas hóspedes que são pequenas para serem envolvidas por moléculas de CD porque estas escaparão do interior da cavidade. Também é impossível a formação de complexo com moléculas que não possam penetrar dentro da cavidade da CD, mas se certos grupos ou cadeias laterais da molécula volumosa podem penetrar, a formação do complexo é possível. Usualmente são formados os complexos 1:1 ( CD: hóspede), porém, quando uma molécula hóspede é muito longa para se acomodar em uma cavidade e sua outra extremidade também é responsável pela formação do complexo, podem ser formados razões 2:1, 2:2, 3:1, 3:2, 4:5, etc. Contudo também é possível formar o complexo 1:2. Não somente a estequiometria mas também a polaridade de determinadas moléculas hóspedes determina se a inclusão pode ocorrer. Em geral moléculas hidrofóbicas ou alguns resíduos hidrofílicos têm a mais alta afinidade pela cavidade da CD em solução aquosa. A hidratação de um complexo de ciclodextrina com um hóspede hidrofóbico é favorecida energeticamente quando comparado com a hidratação separada dos componentes (BEKERS et al., 1991). A Figura 2.13 mostra uma representação esquemática de complexos hospedeiro:hóspede das principais ciclodextrinas (DUCHÊNE & VAUTION, 1986).

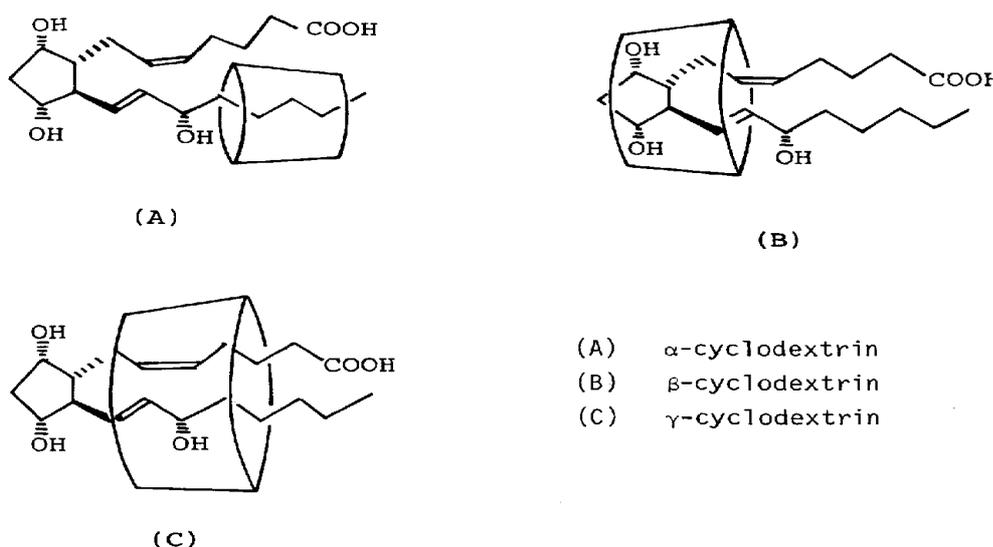


FIGURA 2.13 Representação esquemática de complexos hospedeiro:hóspede das principais ciclodextrinas (DUCHÊNE & VAUTION, 1986).

Na Figura 2.14 mostra-se a formação de complexos de inclusão mediante a incorporação de água ou moléculas orgânicas em sua cavidade, através da constituição de ligações fracas entre a molécula hóspede e a molécula hospedeira. Os círculos brancos pequenos representam as moléculas de água, ao passo que os maiores representam a cavidade das ciclodextrinas. A superfície externa da ciclodextrina é circundada por moléculas de água e estas estão também incluídas na cavidade. A molécula orgânica hóspede, mostrada no lado direito superior, tem uma parte apolar que tende a repelir as moléculas da água e uma cadeia polar lateral que tende a rodear-se de moléculas de água. O resultado da complexação é que a parte apolar da molécula entra na cavidade da ciclodextrina expulsando as moléculas de água que lá se encontravam, enquanto a parte polar hidratada fica no exterior da cavidade.

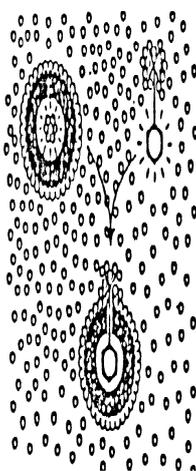


FIGURA 2.14 Representação esquemática da formação do complexo de inclusão (TABUSHI, 1982).

Uma vez hidratadas, as  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ - ciclodextrinas contém 6, 11 e 17 moléculas de água, respectivamente. Estas moléculas podem ser substituídas por moléculas de compostos apolares ou menos polares que a água. Neste processo em que há ganho de energia, em reação rápida e reversível formam-se os complexos de inclusão.

Na ausência de molécula hóspede, a cavidade hidrofóbica, que atua como hospedeira, é ocupada por molécula de água (TABUSHI, 1982). Contudo uma molécula hóspede específica, quando adicionada à solução de ciclodextrina, expulsa estas moléculas de água e ocupa ela própria esta cavidade. Como detalhado na representação esquemática da Figura 2.14.

Na Figura 2.15 apresenta-se um exemplo típico de complexação onde, as moléculas de água internas à cavidade da ciclodextrina no início da reação são substituídas pela molécula do p-Xileno.

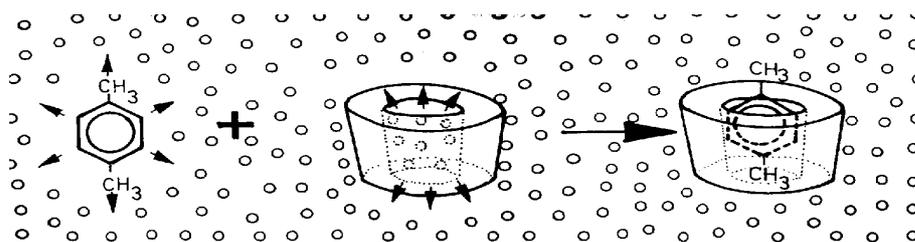


FIGURA 2.15 Representação esquemática da formação do complexo de inclusão da ciclodextrina. A molécula hóspede é o p-Xileno e os pequenos círculos representam as moléculas de água (SZEJTLI, 1988).

Além da interação hidrofóbica, outras forças, porém menos intensas, também participam deste processo.

Após a formação do complexo com a ciclodextrina, na cavidade desta não permanecem moléculas de água, e a molécula hóspede fica presa às paredes por forças de Van der Waals. Uma representação deste mecanismo é mostrado na Figura 2.16 (TABUSHI, 1982).

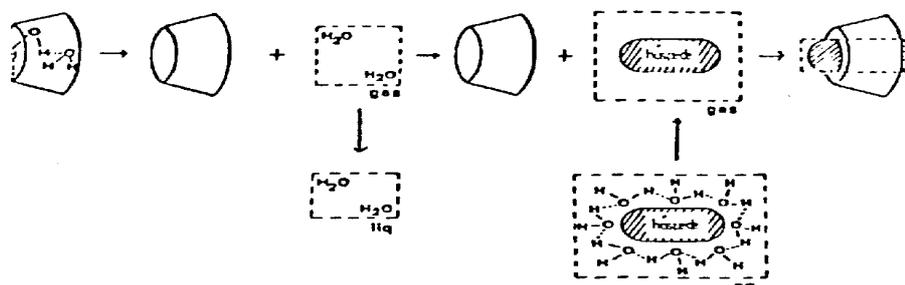


FIGURA 2.16 Processo termodinâmico hipotético da formação do complexo de inclusão da ciclodextrina (TABUSHI, 1982).

A preparação do complexo de inclusão faz-se geralmente em fase líquida. A formação de complexos em fase sólida é, dentro de certos casos, termicamente espontânea, apesar da estabilidade ser maior em solução aquosa (DUCHÊNE & VAUTION, 1986).

A  $\beta$ -ciclodextrina especificamente, é a mais utilizada para a formação dos complexos de inclusão. Sua solubilidade limitada, que aumenta com a temperatura, deve-se à formação de pontes de hidrogênio. A complexação com a molécula hóspede ocorre

somente em solução. O emprego de temperatura elevada permite atingir maior concentração de  $\beta$ -CD.

Essa propriedade de formar complexos de inclusão das CD tem sido muito utilizada na indústria farmacêutica, alimentícia, entre outras, devido às alterações que ocorrem nas propriedades físicas e químicas das moléculas hóspedes (BENDER, 1986; DUCHÊNE, 1987; SZEJTLI, 1988; FUJIWARA et al., 1992; FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

### 2.5.10 TOXICOLOGIA DAS CICLODEXTRINAS

A primeira condição necessária para que um novo produto seja utilizado pela indústria farmacêutica ou alimentar, é que ele tenha sido estudado detalhadamente quanto ao metabolismo e toxicidade (SZEJTLI, 1984).

As primeiras informações publicadas sobre toxicologia das ciclodextrinas foram um tanto desencorajadoras (FRENCH, 1957). Segundo o autor, administrando  $\beta$ -CD à comida de ratos, resultou na morte dos animais. Embora os experimentos ainda não fossem tão conclusivos, levaram a crer que as ciclodextrinas exibiam propriedades extremamente tóxicas ou as amostras de CD usadas, provavelmente, continham substâncias tóxicas; já que estudos toxicológicos recentes discordaram definitivamente destes resultados (SZEJTLI & SEBASTYÉN, 1979).

Estudos de toxicidade oral de ratos, tratados com doses diárias de 200, 400 e 600 mg, registros semanais de pesos não mostraram nenhum efeito depressivo. Nenhuma influência clara na comida foi encontrada. Exames bioquímicos dos animais não revelaram mudanças relacionadas ao tratamento. Enfim, análises microscópicas e autópsia detalhada dos animais não apontaram toxicidade anormal na administração oral da  $\beta$ -CD (SZEJTLI J., 1988).

Segundo Andersen et al. (1963), citados por SZEJTLI & SEBASTYÉN (1979), na administração oral de amido e ciclodextrinas radioativas a ratos, observou-se que a expiração do  $\text{CO}_2$  radioativo devido ao amido, ocorria entre 1 e 2 horas após a ingestão, e o da  $\beta$ -CD entre 8 e 9 horas. Segundo os pesquisadores, a  $\beta$ -CD somente era absorvida, após a hidrólise, pelas enzimas da microflora intestinal, sendo em seguida metabolizada pela mesma rota do amido.

A administração oral de um hidrolisado de amido (contendo 38% de  $\beta$ -CD e 2,8% de  $\alpha$ -CD) e  $\beta$ -cristalina (97% pura), a ratos e cães, também em doses diárias de até 600 mg por kg de peso corporal, não causou diferenças significativas em relação ao grupo de animais controle, segundo os testes clínicos e bioquímicos. Os estudos patológicos e histopatológicos realizados após seis meses, não provaram qualquer alteração do sistema digestivo, nervoso central e circulatório. A  $\beta$ -CD não apresentou qualquer efeito embriotóxico ou teratogênico. Os testes de cromossomas desenvolvidos com ratos, após seis meses, a incidência de aberração espontânea, e mesmo mutação não foi observada (SZEJTLI & SEBASTYÉN, 1979).

Dados disponíveis na literatura, onde os autores detalham experimentos de CD administrada oralmente em ratos e cães é considerada não tóxica se a dose diária for inferior a 600 mg/kg ou não mais que 3% da dieta. Em aplicações humanas potenciais para drogas e estabilização de sabor, a dose diariamente esperada raramente passa de 1 - 2 g/dia (SZEJTLI, 1988).

Em administração subcutâneas, sinais de intoxicação foram encontrados. Em animais que sobreviveram ao tratamento, observou-se o desaparecimento destes sintomas rapidamente, geralmente em 24 horas (SZEJTLI, 1984).

Um tratamento subcutâneo de sete dias com uma dose diária de 450 mg/kg resultou numa série de mudanças histoquímicas no rim dos ratos. De acordo com os estudos eletromicroscópicos, o efeito tóxico das ciclodextrinas no rim é manifestado por mudanças nas organelas vaculares dos segmentos dobrados do tubo proximal (Hiasa et al., 1984 - citado por SABIONI, 1991).

Injeções diárias em ratos por 15 a 30 dias usando 0,1 mL de solução contendo 10% de  $\alpha$ -CD, aumentaram o tamanho do fígado, porém diminuiram a quantidade de gordura crua (Miazaki et al., 1979 - citado por SABIONI, 1991).

A administração intravenosa de  $\alpha$  e  $\beta$ -CD à ratos, em quantidades elevadas (cerca de 788 mg/kg) revelaram sinais de intoxicação renal. A administração de 1400 mg de  $\alpha$ -CD e 1820 mg de  $\beta$ -CD por kg de peso corporal, resultou na morte de 100% dos animais, após 24 horas. Porém, tratamento similar com 450 mg/kg de  $\beta$ -CD resultaram em nefroses severas, mas nenhuma morte (SZEJTLI & SEBASTYÉN, 1979).

Em conclusão, a administração de ciclodextrinas via oral não apresenta problemas para o consumo humano de animais, porém a administração intravenosa, principalmente de  $\beta$ -CD, causa problemas renais. É por isso que a indústria farmacêutica está muito interessada no desenvolvimento e aplicação de derivados altamente solúveis, como por exemplo, a hidroxipropil- $\beta$ -CD.

A literatura sobre o assunto é bastante ampla, sugerindo-se consultar, para maiores esclarecimentos: SZEJTLI, 1982; DUCHÊNE, 1987; SZEJTLI, 1988; FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

### 2.5.11 APLICAÇÕES DAS CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas são compostos cíclicos que apresentam uma cavidade relativamente apolar, esta característica as torna altamente suscetíveis à formação de complexos de inclusão com muitos compostos orgânicos, provocando uma alteração nas propriedades físicas e químicas dessas substâncias. Em função desta e de outras propriedades, as CD são amplamente utilizadas nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos, agro-alimentícias e química analítica (DUCHÊNE, 1987; SZEJTLI, 1988; LEE & KIM, 1991).

A Tabela 2.6 apresenta um resumo das principais aplicações, vantagens e algumas referências bibliográficas que tratam especificamente do assunto.

TABELA 2.6 Resumo das principais aplicações e vantagens das CDs (BENDER,1986).

SETOR	VANTAGENS	APLICAÇÕES	REFERÊNCIAS
<b>Agro-Alimentício</b>	Estabilização de cores e de aromas; Redução de maus sabores e odores; Estabilização de emulsões, etc.	Suco de frutas, bombons e chás; Extrato de plantas, molhos e queijos; Sopas de peixes, etc.	Duchêne, 1987; Pszczola, 1988
<b>Farmacêutico</b>	Estabilização (calor e oxidação); Melhoramento da biodisponibilidade; Melhoramento da solubilidade.	Anti-inflamatórios;  Substitutos sanguíneos; Antibióticos e anticolesterol.	Duchêne, 1987;  Szejtli, 1988; Frömming & Szejtli, 1994.
<b>Cosmético</b>	Estabilização (calor, hidrólise e oxidação) Redução da volatilidade;	Bases emulsificantes; Loções, desodorantes, cremes, pastas, etc.	Szejtli, 1988; Frömming & Szejtli, 1994.
<b>Agrícola</b>	Estabilização de fungicidas; Controle de germinação; Melhoramento de ação dos pesticidas.	Cereais;  Organofosfóricos.	Szejtli, 1988.
<b>Analítico</b>	Interações específicas entre moléculas.	Cromatografia de afinidade, HPLC, etc.	Duchêne, 1987; Szejtli, 1988.
<b>Outros</b>	Inclusão de bactérias; Desintox. do tabaco, etc.	Pinturas industriais, Filtros de cigarro, etc.	Frömming & Szejtli, 1994.

### 2.5.11.1 Aplicação na indústria farmacêutica

Na indústria farmacêutica as ciclodextrinas são utilizadas para vários fins. A inclusão de uma molécula de fármaco na ciclodextrina pode alterar consideravelmente suas características, principalmente no plano farmacotécnico: modificação da solubilidade e da biodisponibilidade, redução de certos efeitos secundários, transformação do estado líquido ao estado sólido, melhoria da estabilidade no estado sólido ou, às vezes em meio líquido (SZEJTLI, 1988).

São as seguintes as principais aplicações farmacêuticas das ciclodextrinas: (SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991).

- (i) - aumento da estabilidade das moléculas hóspedes inclusas contra hidrólise, oxidação, fotodecomposição e desidratação;
- (ii) - aumento da solubilidade do fármaco;
- (iii) - liberação melhorada do fármaco;
- (iv) - aumento da biodisponibilidade do fármaco;
- (v) - conversão de substâncias voláteis e líquidas em formulações sólidas;
- (vi) - prevenção da evaporação do fármaco;

- (vii) - correção do odor e sabor desagradáveis do fármaco;
- (viii)- redução da ação irritante do fármaco sobre as mucosas gástrica e intestinal e de outros efeitos adversos, como hemólise, por exemplo.
- (ix) - prevenção das interações fármaco/fármaco e/ou fármaco/aditivo.

### **2.5.11.2 Aplicação em cosméticos**

As investigações conduzidas revelam as muitas vantagens das ciclodextrinas. É sabido que a sua utilização ajuda efetivamente a aumentar a estabilidade e prolongar a ação dos compostos ativos. A irritação e os efeitos colaterais de certos cosméticos de materiais naturais são diminuídos. Acredita-se que esta diminuição é função da dissimulação de parte da molécula envolvida no interior da cavidade da ciclodextrina (DUCHÊNE, 1987).

Em propriedades de encapsulação, as moléculas envolvidas na cavidade das ciclodextrinas, ou seja, isoladas do meio ambiente, são mais ou menos protegidas dos ataques externos tais como oxigênio e umidade do ar, solventes hidrofílicos nos quais as inclusões podem ser dissolvidas, entre outros (SZEJTLI, 1988).

Os outros agentes implicadores de degradação são calor e luz. Um aumento de temperatura ou exposição à luz causa excitação dos elétrons desestabilizando as moléculas, tornando-as mais reativas. Uma molécula incluída numa ciclodextrina experimenta uma redução de seu meio, que pode explicar sua maior estabilidade. Uma outra explicação é dada pelo estado físico das substâncias: muitos líquidos, quando incluídos são convertidos em sólidos, provocando com que as inclusões apresentem maiores pontos de ebulição, evaporação e sublimação, do que os produtos líquidos puros (não incluídos) (Szejtli, 1991a, b - citado por SABIONI, 1991).

Como na aplicação de alimentos, as ciclodextrinas podem ser usadas para reduzir os odores desagradáveis de certos componentes cosméticos (SZEJTLI, 1988).

Em função destas investigações o uso das ciclodextrinas em cosmetologia parece ser importante para os formulados. Mesmo sendo as pesquisas neste campo consideradas menos básicas que na farmácia, conclusões positivas podem ser extraídas de suas análises (SZEJTLI, 1988; FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

### **2.5.11.3 Aplicação em alimentos**

A primeira publicação referente à aplicação de ciclodextrinas nos alimentos industrializados data de 1962, e o número de patentes tem crescido consideravelmente, especialmente desde 1981 (SZEJTLI, 1988)

A maioria das matérias-primas encontradas nos alimentos industriais são descritas como adequadas para inclusão. Aromas e sabores estão entre as substâncias mais frequentemente descritas, juntamente com produtos bactericidas, enzimas, extrato de plantas, vitaminas, óleos e gorduras, e antioxidantes, que podem ser incluídos antes de adicionar à composição de alimentos industriais (DUCHÊNE, 1987).

O principal valor reconhecido da inclusão de componentes de alimentos é o mesmo daqueles ingredientes ativos nos produtos medicinais: aumentar a estabilidade dos componentes, em ambas matérias primas e produtos acabados industrializados. Isto é alcançado essencialmente por produtos voláteis e/ou aqueles sensíveis à oxidação e/ou fotoativos e/ou termoativos. A proteção das matérias primas é portanto vista por produtos quimicamente e fisicamente instáveis. Em outras palavras, não se refere à proteção contra microorganismos. Entre estes compostos, a inclusão de agentes aromatizantes, frequentemente de alto valor comercial aparece mais para melhorar a preservação. Adoçantes, extratos de plantas, óleos, vitaminas e antissépticos são também descritos como sendo mais estáveis (DUCHÊNE, 1987).

A força de retenção melhorada em produtos acabados é também uma das vantagens reconhecidas da inclusão. Isto de fato causa melhor retenção de água numa grande variedade de alimentos, incluindo massas, confeitos, produtos da estação e queijos. A retenção do sabor nos alimentos é também melhorada por sua inclusão nas ciclodextrinas (DUCHÊNE, 1987).

Apesar do grande potencial das ciclodextrinas no setor alimentício, não se pode afirmar que estes compostos já fazem parte da alimentação diária. De fato cada país, independentemente, autoriza o uso de um aditivo específico de alimento. No que se refere a autorização de ciclodextrinas em produtos alimentícios, é portanto necessário consultar as listas de aditivos autorizadas em cada país. Assim as ciclodextrinas tem sido autorizadas para sabores, há cerca de 20 anos na Hungria. Da mesma forma tem sido autorizadas no Japão como “aditivos naturais de alimentos” desde 1976. Enfim, gradativamente, as ciclodextrinas têm se mostrado cada vez mais promissoras e isto pode eventualmente levar à autorização do seu uso num futuro próximo (SZEJTLI, 1984).

#### **2.5.11.4 Aplicação em produtos agrícolas**

Um grande número de patentes e publicações referentes ao uso das ciclodextrinas em agronomia, reflete o valor considerável destas moléculas nesta área (SAENGER, 1980; DUCHÊNE, 1987).

As piretrinas são muito tóxicas aos insetos e pouco tóxicas aos animais de sangue quente. Elas constituem um óleo amarelado com grande sensibilidade à luz, o que tem dificultado seu emprego como inseticida. Entretanto, a inclusão das piretrinas com a  $\beta$ -CD forma um pó que é facilmente manuseável, muito estável e tóxico aos insetos, após um longo período de aplicação (SAENGER, 1980).

Além da formulação de pesticidas, as ciclodextrinas tem sido usadas também na formulação de fungicidas, herbicidas, estabilizantes de composição, e outros usos (SZEJTLI, 1988; FRÖMMING & SZEJTLI, 1994).

#### **2.5.11.5 Aplicação em produtos industrializados**

O uso das ciclodextrinas em produtos industrializados é extremamente heterogêneo. A maioria dos projetos de pesquisa se referem a processos de reprodução. Outras indústrias, tais como: indústrias de tabacos, inibidores de ferrugens e detergentes

também usam as ciclodextrinas. As CDs também estão incluídas na composição de certos meios de cultura de células (DUCHÊNE, 1987).

Nos processos de reprodução, pode-se citar: fotografia, fototermografia, termografia, tintas, entre outros. Além de outras aplicações como, tabacos, inibidores de corrosão, detergentes industriais, etc.

#### **2.5.11.6 Aplicações em produtos gerais**

Neste aspecto, os produtos também são diversificados, como embalagens, desodorantes, detergentes, inseticidas e agentes esterilizadores domésticos. Entre estes produtos as embalagens ocupam o lugar de liderança. As ciclodextrinas são usadas por sua força adesiva nos produtos alimentícios (Kak e Fujishoro, 1985 - citado por DUCHÊNE, 1987) e para estabilizar certos componentes de embalagens, tais como: antissépticos, fungicidas e perfumes.

#### **2.5.11.7 Aplicações em cromatografia**

As ciclodextrinas e seus polímeros solúveis ou insolúveis podem ser utilizados como fases móveis em cromatografia em camada fina, líquida, em gel; ou ainda como fase estacionária na cromatografia gás-líquido, gás-sólido, líquida, de afinidade ou em gel. São úteis para separação de uma ampla faixa de isômeros (SZEJTLI, 1988).

#### **2.5.11.8 Aplicações na biotecnologia**

A aplicação das ciclodextrinas na biotecnologia está sendo introduzida nos processos de cultivo de células ou formação de um produto mediado por uma célula ou enzima. Todas as aplicações estão ancoradas na formação dos complexos com substâncias orgânicas. Em algumas aplicações estas substâncias são exógenas e atuam como substrato para as enzimas ou células. As principais aplicações são (BAR, 1996):

- (i) - bioconversão em meios contendo CDs;
- (ii) - cultivo de células de animais e microbianas;
- (iii)- biossíntese de antibióticos e proteínas por fermentação;
- (iv)- degradação microbiológica em meios contendo CD.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, além de apresentar os principais materiais e equipamentos, também descreve-se a metodologia utilizada no desenvolvimento experimental deste trabalho.

No item inerente aos materiais (item 3.1) a ênfase é dada: **3.1.1-** à matéria prima do substrato (fécula de mandioca); **3.1.2-** à enzima produtora de ciclodextrina (CGTase - ciclodextrina glicosil transferase); **3.1.3-** à levedura; **3.1.4-** aos reagentes e nutrientes; **3.1.5-** ao sistema experimental; e **3.1.6-** aos equipamentos utilizados.

Por outro lado, no tópico relativo à metodologia empregada na realização dos ensaios (item 3.2), encontra-se a descrição detalhada de como foram conduzidos os ensaios: **(a)-** determinação de glicose; **(b)-** determinação do teor de proteína da CGTase; **(c)-** preparação da solução de substrato; **(d)-** determinação da  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD); **(e)-** determinação da atividade enzimática da CGTase (WACKER); **(f)-** efeito do pH na atividade da CGTase; **(g)-** determinação da influência da concentração de CGTase na produção de  $\beta$ -CD; **(h)-** influência dos nutrientes auxiliares da fermentação; **(i)-** efeito do etanol na produção de  $\beta$ -CD; **(j)-** produção de  $\beta$ -CD por Fermentação e Ciclização Simultâneas (F.C.S.).

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 SUBSTRATO

O substrato utilizado foi fécula de mandioca (COPAGRA), com teor de umidade médio de 12,5 %.

A solução de substrato, amido liquefeito em vários graus de hidrólise, foi preparada conforme a metodologia descrita no item 3.2.3.

##### 3.1.2 ENZIMA

Utilizou-se a enzima ciclodextrina glicosil transferase (CGTase) fornecida pela WACKER (Germany), obtida de *Bacillus alkalophilic* clonado em *E. coli*, com atividade específica de 70,5 U/mg de proteína, determinada em pH 6,0 e 35°C e um teor de proteína de 0,997 mg proteína/mL de solução estoque.

Foram utilizados 0,12 mL e 0,50 mL de CGTase em 150 mL de solução de substrato.

### 3.1.3 LEVEDURA

Utilizou-se levedura de panificação seca FLEISCHMANN contendo *Saccharomyces cerevisiae*. Na reação de Fermentação e Ciclização Simultâneas (F.C.S.) utilizou-se a proporção de 12% p/v, ou seja, 18 g de levedura em 150 mL substrato.

### 3.1.4 REAGENTES ANALÍTICOS

A glicose utilizada como padrão para análise do grau de hidrólise do amido foi a do laboratório REAGEN.

Na análise da concentração de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) utilizou-se fenolftaleína da MERCK.

A  $\beta$ -CD utilizada como padrão foi a fornecida pela SIGMA, artigo C-4767

Na determinação do teor de proteína utilizou-se como padrão a BSA-Albumina Bovina Sigma - A 2153, contendo 1,6% H<sub>2</sub>O e Brilhante de Comassie Blue (FLUKA - G 250 / 27815).

Na determinação da atividade enzimática da CGTase WACKER empregou-se o amido solúvel da MERCK.

Os nutrientes utilizados na fermentação alcoólica, superfosfato triplo e sulfato de amônio, foram os comerciais.

Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico P.A., como por exemplo tampão tris-HCl, NaOH, HCl, etc.

### 3.1.5 SISTEMA EXPERIMENTAL

Foram utilizados dois sistemas experimentais, um para hidrólise do amido e outro para a produção de ciclodextrinas.

Para a hidrólise do amido utilizou-se um bequer de 1 000 mL imerso em banho maria tipo Dubnoff. A temperatura do banho foi controlada a 95°C e o tempo de reação em função do grau de hidrólise desejado. A Figura 3.1 mostra um esquema desse sistema.

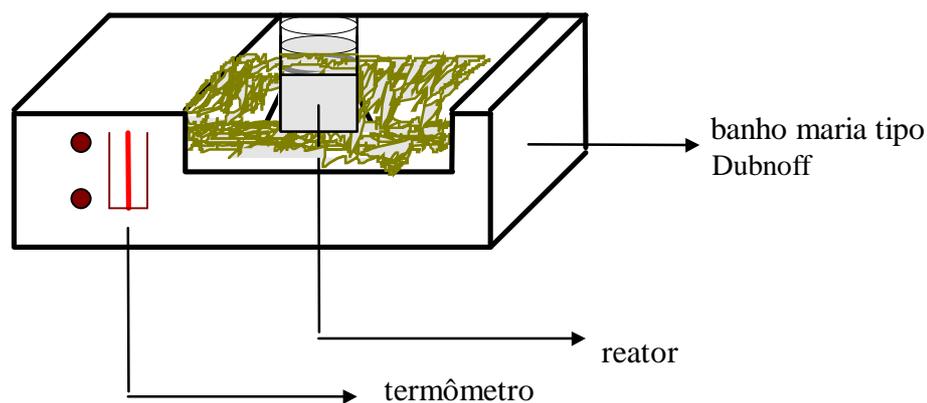


FIGURA 3.1 Sistema experimental utilizado para a hidrólise da solução de amido.

Na produção de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) utilizou-se o banho maria tipo Dubnoff, com suportes para erlenmeyers de 250 mL com agitação suave. A Figura 3.2 mostra um esquema desse sistema.

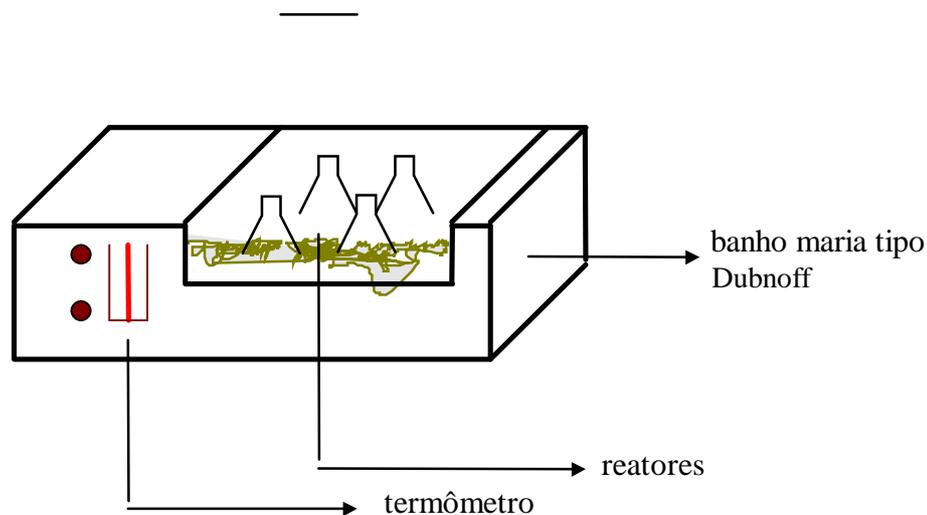


FIGURA 3.2 Sistema experimental para produção de  $\beta$ -CD.

### 3.1.6 EQUIPAMENTOS

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho experimental, foram:

- (i) - Espectômetro Shimadzu/MICRONAL, modelo B-493 (200 - 1100 nm);
- (ii) - Banho maria tipo Dubnoff com agitação tipo pendular, circulação externa de água e controle de temperatura;
- (iii)- Destilador semi-automático com refluxo e temperatura de destilação controlada;
- (iv)- Cromatógrafo a gás, modelo Varian 1420;
- (v) - Centrífuga para 6 (seis) tubos de ensaio com velocidade até 5000 rpm, FANEM, modelo BABY II.

## 3.2 MÉTODOS

A seguir é apresentada a metodologia experimental utilizada nas várias etapas do trabalho.

### 3.2.1 DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

A determinação dos açúcares redutores, expressos em glicose, contidos no amido liquefeito foi realizada utilizando-se o método de Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945).

#### 3.2.1.1 Princípio do método

O grupo aldeído dos açúcares redutores reduz o íon cúprico a cuproso. O ácido arsenomolibdico reoxida o óxido cuproso formado e por sua vez é reduzido a uma mistura de óxidos de molibdênio de cor azul. A cor desenvolvida é comparada com a de uma solução de glicose de concentração conhecida e submetida ao mesmo processo.

### 3.2.1.2 Preparação da curva padrão e análise das amostras

A concentração de glicose presente na solução de amido era calculada utilizando-se uma curva de calibração obtida através da determinação das absorvâncias de uma série de 21 concentrações padrão de glicose submetidas ao mesmo tratamento, no mesmo comprimento de onda, e na faixa de concentração variando de 0 a 100 µg/mL.

As amostras obtidas nos ensaios de hidrólise da solução de amido eram diluídas com água destilada na proporção de 1:400 para se adequarem à faixa de operação da curva padrão.

Em tubos de ensaio colocava-se 1 mL da amostra previamente diluída, acrescentava-se 1 mL do reativo de Somogyi e fervia-se por 10 min. Após resfriamento, em água à temperatura ambiente, adicionava-se 1 mL do reativo de Nelson e 7 mL de água destilada. Por fim, agitava-se o tubo em vortex e determinava-se as absorvâncias correspondentes a cada amostra em espectrofotômetro a 540 nm, utilizando-se cubetas plásticas do tipo standart com 1 cm de caminho óptico.

A calibração do zero no aparelho era feita utilizando-se água destilada.

A partir da curva de calibração de glicose podia-se determinar as concentrações iniciais de glicose, bem como a porcentagem de açúcares redutores presentes na solução de amido.

## 3.2.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA

O teor de proteína da enzima ciclodextrina glicosil transferase (CGTase) era determinado pelo método de Bradford, Comassie Blue (BRADFORD, 1976) utilizando-se como padrão soro albumina bovina (BSA).

### 3.2.2.1 Princípio do método

A dosagem colorimétrica para proteína causa uma mudança na absorção máxima da cor de 465 nm a 595 nm, e um aumento na absorção em 595 nm que é monitorado.

Este método baseia-se na observação de que Brilhante de Comassie existe em duas formas de cores diferentes, vermelho e verde. A forma vermelha é convertida em azul pela dosagem colorimétrica de proteína. O complexo formado apresenta um alto índice de extinção levando assim a uma grande sensibilidade na medição da proteína.

### 3.2.2.2 Preparação da curva padrão e análise das amostras

A concentração de proteína era calculada a partir de uma curva de calibração obtida através da determinação das absorvâncias de uma série de concentrações padrão de albumina na faixa de 0,0 a 0,10 mg/mL. Para estas concentrações as absorvâncias lidas no aparelho estavam na faixa de 0,000 a 0,351.

Na preparação do reagente de Bradford, tomava-se uma solução estoque preparada com Brilhante de Comassie e etanol 95% (1:50 p/v). Para a análise das amostras, preparava-se o reagente colorimétrico a partir da solução estoque e ácido fosfórico 85%, nas proporções 25 e 50 mL respectivamente, e por fim, completava-se para um volume de 500 mL com água destilada.

As amostras da enzima eram diluídas com água destilada na proporção de 1:10 e 1:20 para se adequarem à faixa de operação do método.

A análise de proteína da CGTase líquida era realizada tomando-se alíquotas de 0,3 mL, em triplicata, das duas diluições, em seguida adicionava-se em cada tubo de amostra 3 mL do reagente de Bradford. Após 2 minutos da mistura e agitação em vortex, as amostras eram lidas a 595 nm utilizando-se cubetas plásticas de 1 cm de caminho óptico. O teste era conduzido à temperatura ambiente.

A calibração do zero no aparelho era feita mediante um teste em branco, preparado pela adição de 3 mL do reagente de Bradford e 0,3 mL de água destilada, que era submetido ao mesmo tratamento das amostras.

### 3.2.3 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE AMIDO LIQUEFEITO E DETERMINAÇÃO DA DEXTROSE EQUIVALENTE (D.E.)

A metodologia de preparação da solução de amido descrita nesta seção foi a que apresentou melhores características. Foram testadas várias concentrações de amido e volumes de enzima.

O teor de umidade do amido era determinado em estufa a  $\pm 105$  °C, até peso constante.

A solução de amido liquefeito com concentração nominal a 10% p/v era obtida conforme apresentado a seguir:

- (i) - pesava-se 80 g de amido (peso úmido);
- (ii) - em um bequer de 1 000 mL colocava-se: 750 mL de água destilada, e ajustava-se o pH para 6,0 com NaOH 1N, HCl 1N e tampão 6,0 tris-HCl 0,05M;

- (iii) - aquecia-se o bequer com a solução em fogo brando até atingir a temperatura de 60°C;
- (iv) - adicionava-se ao bequer 30 mL de solução de trabalho (diluição 1:100) de  $\alpha$ -amilase TERMAMYL - NOVO 120 L;
- (v) - quando a temperatura da solução atingia 95°C, levava-se o bequer para o banho maria e deixava-se hidrolisar a solução de amido por tempos variáveis conforme o grau de hidrólise desejado;
- (vi) - a reação de hidrólise era interrompida adicionando-se 2 mL de HCl 1N à solução liquefeita sendo em seguida submetida à ebulição por 10 minutos em fogo contínuo, a fim de se inativar a enzima  $\alpha$ -amilase;
- (vii) - resfriava-se a solução de amido liquefeito à temperatura ambiente, e em seguida completava-se o volume para 750 mL com água destilada;
- (viii)- o pH era corrigido novamente para 6,0 com NaOH 1N e tampão Tris - HCl pH 6,0, 0,05M;
- (ix) - após a hidrólise, retirava-se uma alíquota da solução de amido, a fim de determinar o teor de açúcares redutores e calcular a dextrose equivalente (D.E.).

Para a determinação da dextrose equivalente (D.E.), eram retiradas alíquotas de 0,50 mL da solução de amido hidrolisado e conforme metodologia descrita no item 3.2.1, determinava-se os teores de açúcares redutores (AR), expressos em glicose. A D.E. era resultante da concentração dos açúcares em relação ao percentual de amido em solução. A equação 3.1 mostra a forma de se calcular a D.E.

$$\text{D.E.} = \frac{\text{AR (\%)} \times 100}{\text{substância seca (\%)}} \quad (3.1)$$

### 3.2.4 DETERMINAÇÃO DA $\beta$ -CICLODEXTRINA

Neste trabalho, tanto a atividade da CGTase quanto a  $\beta$ -CD produzida na reação de ciclização do amido com CGTase foi calculada por dois métodos distintos: (a) equação da reta; (b) teoria da complexação com fenolftaleína conforme metodologia desenvolvida por HAMON & MORAES (1990), detalhada no Anexo 8.1.

A curva de calibração de  $\beta$ -CD, utilizando como indicador colorimétrico a fenolftaleína, foi obtida como descrito a seguir:

- (i) - preparava-se uma solução estoque de fenolftaleína (PHE) 3 mmol, pesando-se 0,0955g de PHE e completando o volume final de 100 mL, com etanol 95%;
- (ii) - preparava-se uma solução tampão carbonato (pH 10,5 e 0,6 M) diluindo-se  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{NaHCO}_3$ , respectivamente 5,088g e 1,008g, em água destilada até um volume final de 100 mL;
- (iii) - preparava-se uma solução estoque contendo 0,5 mmol de  $\beta$ -CD diluindo-se 0,05675g de  $\beta$ -CD padrão em 20 mL de tampão tris-HCl (pH 8,0 e 0,05M) e em seguida completava-se o volume a 100 mL com água destilada;
- (iv) - em nove tubos de ensaio, colocava-se de 0 a 0,8 mL de solução estoque de  $\beta$ -ciclodextrina tamponando-as com tris-HCl 20% até um volume final de 1 mL, ou seja, para o primeiro tubo de ensaio, tomava-se 0 mL da solução de  $\beta$ -CD e 1 mL de solução tampão; no segundo 0,1 mL de  $\beta$ -CD e 0,9 mL de tampão, e assim sucessivamente, até o nono tubo de ensaio;
- (v) - preparava-se a solução de trabalho de fenolftaleína, colocando-se 0,5 mL de fenolftaleína estoque 3 mmol (preparada no sub-item i) e 5 mL de tampão carbonato (preparado no sub-item ii) completando-se o volume com água destilada para 25 mL;
- (vi) - em tubo de ensaio contendo 2,5 mL de solução de trabalho de fenolftaleína (preparada no sub-item v) adicionava-se 0,5 mL de  $\beta$ -CD nas diversas concentrações conhecidas (preparadas no sub-item iv);
- (vii) - agitava-se a mistura em vortex e determinava-se as absorvâncias em espectômetro a 550 nm;
- (viii)- o auto-zero era realizado com duas cubetas contendo, cada uma, 3 mL de água destilada;
- (ix) - os testes eram realizados à temperatura ambiente;
- (x) - os resultados de absorvância em função da concentração de  $\beta$ -CD foram ajustados por uma reta, sendo a equação obtida, utilizada para o cálculo do teor

de  $\beta$ - CD produzido nos ensaios com CGTase.

Para a preparação da curva de calibração de  $\beta$ -CD utilizando-se a teoria da complexação, adotou-se a mesma metodologia descrita anteriormente (sub-ítem i a ix), porém nesse caso os dados de absorvância em função da concentração de  $\beta$ -CD, eram ajustados levando em conta a complexação da  $\beta$ -CD com a fenolftaleína. Este método está detalhado no Anexo 8.1, e foi desenvolvido por HAMON & MORAES (1990).

A equação da reta determinada pela intercessão dos pontos de  $[\beta\text{-CD}] / [1 - (Abs/ Abs_0)]$  e  $Abs_0/Abs$ , fornece os coeficientes linear, angular e inclinação da reta, o que possibilita construir a curva padrão representada pela equação 3.2.

$$[\mathbf{b} - CD] = \left[ 1 - \left( \frac{Abs}{Abs_0} \right) \right] \times \left\{ a + \left[ \frac{(Abs_0 \times b)}{Abs} \right] \right\} \quad (3.2)$$

onde,

a - coeficiente linear;

b - coeficiente angular;

$Abs_0$  - absorvância a 550 nm que representa a ausência de  $\beta$ -CD;

$Abs$  - absorvância da amostra a 550 nm;

$[\beta\text{-CD}]$  - concentração de  $\beta$ -ciclodextrina (mmol).

### 3.2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CGTase

Para determinar a atividade específica da ciclodextrina glicosil transferase (CGTase), é necessário conhecer o teor de proteína da enzima, sendo este determinado pelo método descrito no item 3.2.2.

A atividade da CGTase foi determinada como descrito a seguir:

- (i) - preparava-se uma solução de CGTase na diluição de 1:5000, em pH 8,0 (tampão tris-HCl, 0,05M);
- (ii) - preparava-se uma solução de amido 1% p/v a partir de 1g de amido solúvel, 10mL de  $CaCl_2$ , 20mL de tampão tris-HCl 0,05M, pH 6,0 e água destilada até atingir-se um volume total de aproximadamente 90 mL. Aquecia-se, com agitação, a mistura até à ebulição. Após resfriamento, completava-se o volume para 100 mL

com água destilada;

- (iii) - preparava-se 6 tubos com 1,5 mL de solução de amido liquefeito 1% p/v (preparado no sub-item ii) e aquecia-se a 50°C em banho maria até estabilizar a temperatura das soluções;
- (iv) - em cada tubo da etapa anterior, adicionava-se, a cada 5 minutos, até 30 min, 1,5 mL de CGTase preparada no sub-item i ;
- (v) - retirava-se em intervalos de tempo pré-determinados o tubo do banho, sendo imediatamente imerso em banho fervente por 5 minutos, a fim de se processar a inativação da enzima;
- (vi) - determinava-se a  $\beta$ -CD produzida pelo método da fenolftaleína descrito no item 3.2.4;
- (vii) - a atividade da enzima CGTase era obtida a partir da equação 3.3.

$$A = (K \times V_R \times D) / V_{\text{Enz. dil.}} \quad (3.3)$$

onde,

A - atividade enzimática ( $\mu\text{mol min}^{-1}$  de Enz. estoque);

D - diluição da enzima;

K - inclinação da reta de conc. de CDs, em função do tempo ( $\text{mmol CD L}^{-1} \cdot \text{min.}^{-1}$ );

$V_R$  - volume total de reação (neste teste 3 mL);

$V_{\text{enz. dil.}}$  - volume de enzima diluído (neste teste 1,5 mL).

A atividade específica da enzima utilizada nos ensaios foi igual a 83,27  $\mu\text{mol/min mg prot.}$

### 3.2.6 EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA CGTase

A influência do pH do meio reacional na atividade específica da enzima ciclodextrina glicosil transferase foi determinada pelo método descrito no item 3.2.5, sendo que neste caso a solução de amido liquefeito a 1% p/v era preparada no pH de interesse, que variou de 5 a 8, tendo-se utilizado tampão tris-HCl.

### 3.2.7 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA CGTase NA PRODUÇÃO DE $\beta$ -CD

O objetivo deste ensaio foi determinar o volume de enzima ciclodextrina glicosil transferase (CGTase) a ser adicionado ao meio reacional, a fim de se avaliar a influência da concentração de enzima em relação à produção de  $\beta$ -CD. Nestes ensaios foram mantidos fixos a concentração de substrato, as condições do meio e o tempo de reação. O procedimento dos ensaios está descrito a seguir:

- (i) - a solução de substrato era preparada como descrito no item 3.2.3;
- (ii) - a produção de  $\beta$ -CD era conduzida à temperatura de 38°C em cinco frascos contendo 150mL do substrato, durante 20 horas de reação, onde variava-se apenas o volume de enzima de cada erlenmeyer. Em cada frasco adicionava-se respectivamente, 0,12; 0,24; 0,50; 0,75 e 1mL de CGTase sem diluição;
- (iii)- a  $\beta$ -ciclodextrina produzida era determinada pelo método apresentado no item 3.2.4;

### 3.2.8 INFLUÊNCIA DOS NUTRIENTES AUXILIADORES DA FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE $\beta$ -CD

Como o substrato utilizado neste experimento foi amido liquefeito de mandioca, matéria-prima relativamente pobre em fontes de fósforo e nitrogênio, elementos indispensáveis para o ciclo metabólico da levedura, e conseqüentemente síntese de etanol, há necessidade da adição desses elementos ao meio reacional. A solução de amido foi hidrolisada para D.E. = 24,32

Nestes ensaio o meio reacional foi enriquecido com sulfato de amônio e superfosfato triplo comerciais, na proporção de 1g/L cada.

O método de investigação da influência dos nutrientes foi realizado em frascos erlenmeyers contendo:

- (1)- CGTase (0,15mL) + substrato (150 mL);
- (2)- CGTase (0,15mL) + substrato (150 mL) + nutrientes (0,15g cada).

### 3.2.9 EFEITO DO ETANOL NA PRODUÇÃO DE $\beta$ -CD

A influência do etanol na produção de  $\beta$ -CD foi estudada utilizando-se o sistema experimental mostrado no item 3.1.5. As condições de pH, temperatura, concentração de substrato, volume de enzima, amostragem e tempos de reação, foram os mesmos para todas as situações estudadas.

Foi observado o comportamento da produção de  $\beta$  - CD na presença e na ausência de etanol em soluções de substrato com dextrose equivalente (D.E.) de aproximadamente 10 e 20.

O ensaio foi realizado como descrito a seguir:

- (i) - tomava-se, aproximadamente 32 g de amido de mandioca ( peso úmido) em bequer de 500 mL e adicionava-se 280 mL de água destilada (bequer A);
- (ii) - ajustava-se o pH para 6,0 com tampão tris-HCl 0,05M, pH 6,0; HCl 1N e NaOH 1N;
- (iii) - o mesmo procedimento era utilizado para o bequer (B);
- (iv) - o bequer (A) era levado ao fogo, sempre com agitação, até atingir 60°C;
- (v) - com a solução a 60°C, adicionava-se lentamente 12 mL de  $\alpha$  - amilase TERMAMYL - NOVO diluída na proporção 1:100 (enzima / água);
- (vi) - quando a temperatura atingia 95°C, transferia-se o bequer (A) para o banho termostático que encontrava-se na mesma temperatura e deixava-se reagir por 10 min a fim de se ter uma D.E. aproximadamente igual a 10;
- (vii) - decorrido o tempo desejado, inativava-se a enzima  $\alpha$  - amilase adicionando-se à solução 0,8 mL de HCl 1N, seguindo-se fervura em fogo direto por 10 minutos;
- (viii)- para o bequer (B) utilizou-se o mesmo procedimento, apenas aumentando-se o tempo de hidrólise para 25 minutos, a fim de ter-se uma D.E. da ordem de 20;
- (ix) - tomavam-se alíquotas de 0,5 mL, de ambos os reatores, para determinação da D.E. em cada ensaio;
- (x) - as alíquotas eram diluídas em água destilada na proporção de 1:400 para se ajustarem à faixa de concentração da curva de calibração preparada como descrito no item 3.2.1;
- (xi) - seguindo-se a mesma metodologia descrita no item 3.2.3 determinava-se a Dextrose Equivalente (D.E.) de cada ensaio;
- (xii) - após resfriamento das soluções, completava-se novamente o volume para 300 mL,

com água destilada e, em seguida, reajustava-se o pH dos meios reacionais em 6,0 com NaOH 1N, HCl 1N e tampão tris-HCl 6,0;

- (xiii)- dividia-se o volume de 300 mL para dois erlenmeyers. Repetia-se o procedimento de (i) a (xii) para as duas D.Es., logo totalizando quatro frascos contendo cada um 150 mL de substrato, sendo dois para cada D.E., ou seja, dois reatores com D.E.  $\cong$  10 e dois outros com D.E.  $\cong$  20;
- (xiv)- em um dos erlenmeyers de cada D.E., adicionava-se 5% v/v de etanol e em seguida transferia-se os quatro para o banho termostático ajustado a 38°C;
- (xv) - após atingir-se o equilíbrio térmico, adicionava-se, em cada frasco, 0,15 mL de enzima CGTase;
- (xvi)- alíquotas de 0,5 mL eram retiradas no decorrer da reação. O intervalo de amostragem era de 15, 30 e 60 min., ou seja, na primeira hora de reação, amostras eram retiradas a cada 15 min. Na segunda e terceira hora, a cada 30 minutos e, nas vinte e uma horas restantes, a cada 60 minutos. Estas eram fervidas por 10 minutos levando-se ao banho maria em ebulição a fim de inativar a CGTase;
- (xvii)- a concentração de  $\beta$ -CD era determinada pelo método colorimétrico da fenolftaleína, conforme metodologia apresentada no item 3.2.4.

Um esquema da sequência reacional é apresentado na Figura 3.3

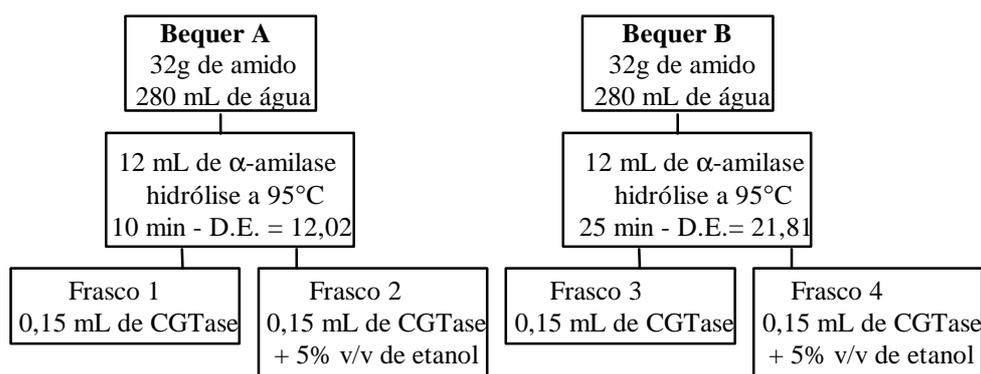


FIGURA 3.3 Sequência reacional para determinação da influência do etanol na produção de  $\beta$ -CD.

### 3.2.10 PRODUÇÃO DE $\beta$ -CD POR FERMENTAÇÃO E CICLIZAÇÃO SIMULTÂNEA (F.C.S.)

Os ensaios de produção de  $\beta$ -CD com várias concentrações de D.E. e várias porcentagens de etanol, foram realizados em duas etapas. A primeira etapa consistiu na preparação do substrato conforme descrito no item 3.2.3, onde apenas mudou-se o tempo de hidrólise do amido, a fim de obter-se diferentes graus de hidrólise, o que leva a diferentes valores de dextrose equivalente (D.E.).

A produção da  $\beta$ -CD deu-se na segunda etapa, e foi dividida em oito ensaios. Estes foram realizados nas mesmas condições de temperatura (38°C), pH (6,0) e tempo de reação (24 horas).

Foram testados dois volumes de enzima CGTase na reação de produção de  $\beta$ -CD: 0,12 mL e 0,50 mL em 150 mL de meio reacional.

O procedimento era semelhante para todos os ensaios e foi conduzido como descrito a seguir:

- (i) - hidrolisava-se o amido em tempo pré-determinado a fim de obter-se a D.E. desejada ( 2 - 25 );
- (ii) - preparava-se três frascos erlenmeyers contendo:
  - (1) - CGTase + substrato (150 mL);
  - (2) - CGTase + substrato (150 mL) + etanol (1, 3 e 5% v/v);
  - (3) - CGTase + substrato (150 mL) + nutrientes ( 0,15g de super fosfato e 0,15g de sulfato de amônio) + levedura (18g).
- (iii) - após a preparação dos reatores, transferia-se para o banho termostático a 38°C;
- (iv) - alíquotas de 0,5 mL eram retiradas no decorrer da reação. O intervalo de amostragem era de 15, 30 e 60 min, ou seja, na primeira hora de reação, amostras eram retiradas a cada 15 min. Na segunda e terceira hora, a cada 30 minutos e, nas vinte e uma horas restantes, a cada 60 minutos. A reação era interrompida fervendo-se as amostras em banho maria durante 10 minutos a fim de inativar a CGTase;
- (v) - após resfriamento das amostras à temperatura ambiente, estas eram conservadas a 4°C até determinação da concentração da  $\beta$ -CD formada;
- (vi) - a concentração de  $\beta$ -CD foi determinada pelo método colorimétrico da fenolftaleína, conforme metodologia apresentada no item 3.2.4;
- (vii) - as amostras da reação de Fermentação e Ciclização Simultâneas (F.C.S.), antes da leitura espectrofotométrica, eram submetidas a uma centrifugação por 5 minutos, a fim de se eliminar as células em suspensão.

Na Tabela 3.1 apresenta-se um resumo das condições dos ensaios de produção de  $\beta$ -CD.

TABELA 3.1 Condições de realização dos ensaios na produção de  $\beta$ -CD.

ENSAIO	CGTase (mL)	D.E.	LEVEDURA (g)	ETANOL ADICIONADO
1	0,12	22,30	-	-
	0,12	22,30	-	3
	0,12	22,30	18	-
2	0,12	24,32	-	-
	0,12	24,32	-	5
	0,12	24,32	18	-
3	0,50	2,69	-	-
	0,50	2,69	-	1
	0,50	2,69	18	-
4	0,50	3,30	-	-
	0,50	3,30	-	3
	0,50	3,30	18	-
5	0,50	6,93	-	-
	0,50	6,93	-	3
	0,50	6,93	18	-
6	0,50	9,87	-	-
	0,50	9,87	-	5
	0,50	9,87	18	-
7	0,50	17,18	-	-
	0,50	17,18	-	5
	0,50	17,18	18	-
8	0,50	22,20	-	-
	0,50	22,20	-	5
	0,50	22,20	18	-

### 3.2.11 DETERMINAÇÃO DO ETANOL NOS ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE $\beta$ -CD

A determinação da porcentagem de etanol formado nos ensaios de Fermentação e Ciclização Simultâneas (F.C.S.) era realizada em cromatógrafo a gás, coluna Carbovax 20 M / Cromossorb WHP, na mesma temperatura de coluna, injetor e detector para todos os testes, respectivamente, 100°C, 125°C e 125°C. O gás de arraste utilizado na determinação foi o Hélio com vazão de 20 mL/min e 165 mA de corrente no detector.

Previamente à determinação do etanol, as amostras eram submetidas ao seguinte tratamento:

- (i) - após o término do ensaio, as amostras eram conservadas a 4°C;
- (ii) - todas as amostras eram centrifugadas a cerca de 3 000 rpm por 10 minutos a fim de separar a levedura;
- (iii)- colhia-se um volume de 50 mL de sobrenadante;
- (iv)- o sobrenadante era destilado sob refluxo, à temperatura de 80°C, coletando-se o destilado em volume final máximo de 10 mL;
- (v) - apenas o destilado era submetido à análise cromatográfica.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de melhor orientar o leitor nas diversas etapas desenvolvidas neste trabalho, optou-se por iniciar este capítulo apresentando-se uma tabela onde são sumarizados os principais tópicos estudados. Portanto, na Tabela 4.1 mostra-se **(a)** os ensaios realizados; **(b)** os itens onde decreveu-se a metodologia utilizada, bem como aqueles em que se apresenta e discute os resultados.

TABELA 4.1 Disposição geral dos ensaios realizados.

<b>ENSAIOS REALIZADOS</b>	<b>APRESENTAÇÃO DO ENSAIO NO ITEM</b>
<b>Curva Padrão</b>	
- Glicose	Metodologia - 3.2.1 Resultados - 4.1.1
- Proteína	Metodologia - 3.2.2 Resultados - 4.1.2
<b>Preparação da solução de amido liquefeito</b>	Metodologia - 3.2.3 Resultados - 4.2.1 Discussão - 4.2.2
<b>Curva Padrão de b-CD</b>	Metodologia - 3.2.4 Resultados - 4.3.1
<b>Determinação da atividade da CGTase</b>	Metodologia - 3.2.5 Resultados - 4.4.1
<b>Efeito do pH na atividade da CGTase</b>	Metodologia - 3.2.6 Resultados - 4.5.1 Discussão - 4.5.2
<b>Influência da concentração da enzima CGTase na produção de b-CD</b>	Metodologia - 3.2.7 Resultados - 4.6.1 Discussão - 4.6.2
<b>Influência dos nutrientes auxiliares da fermentação na produção de b-CD</b>	Metodologia - 3.2.8 Resultados - 4.7.1 Discussão - 4.7.2
<b>Efeito do etanol na produção da b-CD</b>	Metodologia - 3.2.9 Resultados - 4.8.1 Discussão - 4.8.2
<b>Produção de b-CD por Fermentação e Ciclização Simultâneas (F.C.S.)</b>	Metodologia - 3.2.10 Resultados - 4.9.1 Discussão - 4.9.2

## 4.1 CURVA PADRÃO DE GLICOSE E PROTEÍNA

Neste item apresenta-se um exemplo da curva de calibração utilizada para a dosagem de glicose nas amostras, bem como para a determinação do teor de proteína da enzima ciclodextrina glicosil transferase (CGTase).

### 4.1.1 CURVA PADRÃO DE GLICOSE

A Tabela 4.2 e a Figura 4.1 mostram um exemplo de dados de calibração obtidos para a dosagem de glicose pelo método Somogyi-Nelson apresentado no item 3.2.1.

TABELA 4.2 Absorvâncias (Abs) obtidas para concentrações conhecidas de glicose (Cg) pelo método de Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945).

<b>Cg(mg/mL)</b>	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
<b>Abs 540 nm</b>	0,004	0,040	0,082	0,114	0,154	0,179	0,200	0,244	0,266	0,285	0,315
<b>Cg(mg/mL)</b>	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
<b>Abs 540 nm</b>	0,360	0,389	0,398	0,440	0,462	0,507	0,532	0,572	0,600	0,619	

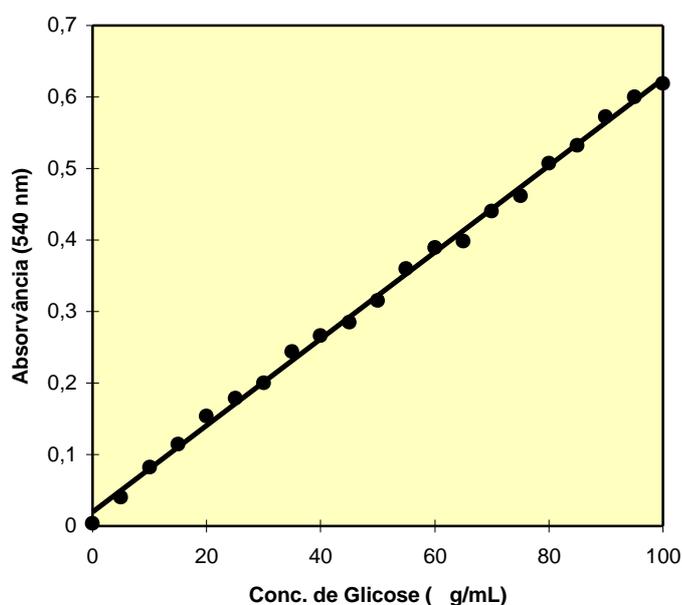


FIGURA 4.1 Curva padrão de glicose pelo método de Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945).

A reta obtida através da regressão linear entre absorvância (Abs) e a concentração conhecida de glicose (Cg), foi:

$$\text{Abs} = 0,0203 + 0,006046 \text{ Cg}, \quad r^2 = 0,9979 \quad (4.1)$$

#### 4.1.2 CURVA PADRÃO DE PROTEÍNA

Um exemplo de dados de calibração obtidos para a dosagem do teor de proteína pelo método descrito no item 3.2.2 é apresentado na Tabela 4.3 e Figura 4.2.

TABELA 4.3 Absorvâncias (Abs) obtidas para concentrações conhecidas de proteína (Cp) pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

<b>Cp (mg/mL)</b>	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,10
<b>Abs 595 nm</b>	0,00	0,040	0,070	0,105	0,145	0,167	0,205	0,243	0,290	0,320	0,351

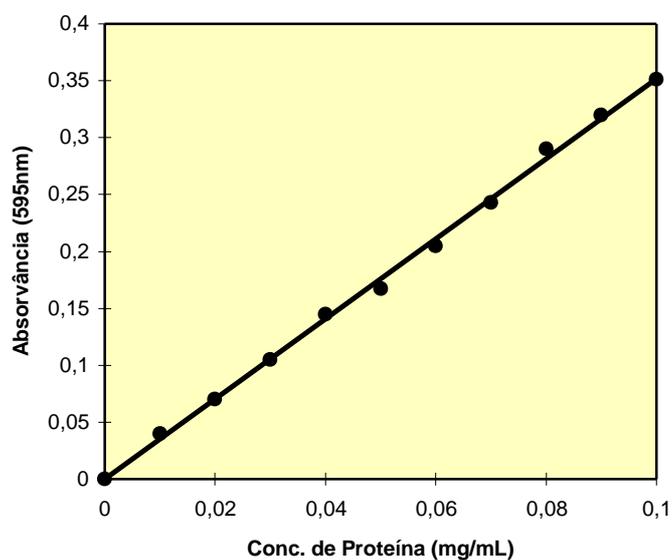


FIGURA 4.2 Curva padrão de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

A reta obtida através da regressão linear entre absorvância (Abs) e a concentração conhecida de proteína (Cp), foi:

$$\text{Abs} = 4,548 \times 10^{-5} + 3,519 \text{ Cp}, \quad r^2 = 0,9981 \quad (4.2)$$

## 4.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE AMIDO LIQUEFEITO

Com a realização deste conjunto de ensaios objetivou-se conhecer o comportamento da D.E. em função da variação dos tempos de reação, a fim de determinar-se o percentual de oligossacarídeos presentes na solução de amido liquefeito em função do teor de glicose da solução. Os ensaios foram realizados conforme metodologia apresentada no item 3.2.3.

### 4.2.1 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Na Tabela 4.4 e Figura 4.3 mostra-se o comportamento da concentração de substrato, expresso em D.E., em função do tempo de hidrólise da solução de amido com enzima  $\alpha$ -amilase.

TABELA 4.4 Valores aproximados de Dextrose Equivalente (D.E.) em função dos tempos de reação (min).

tempo de hidrólise(min)	2	5	10	15	20	25	30	35	40	45
D.E.	2	5	10	15	17	20	22	23	24	25

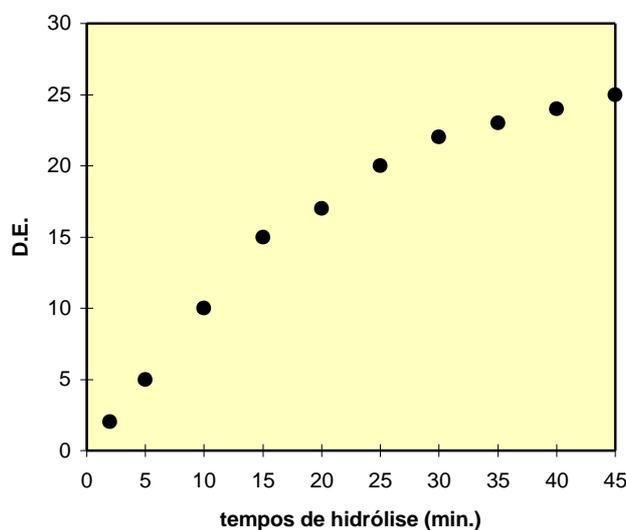


FIGURA 4.3 Concentração de Dextrose Equivalente (D.E.) em função do tempo de hidrólise.

## 4.2.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A observação da Figura 4.3 mostra que não há uma função linear entre o tempo de hidrólise e a D.E. obtida. Estes resultados indicam a necessidade de se realizar mais ensaios, a fim de se determinar a cinética de hidrólise, não só a partir de solução de amido 10% p/v, mas também com concentrações superiores; como por exemplo 30% p/v. Há também a necessidade de analisar os produtos da reação (dextrinas intermediárias) por HPLC de modo a se ter a caracterização exata da solução de amido hidrolisado.

## 4.3 CURVA PADRÃO DE $\beta$ -CD

A curva padrão de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) foi determinada por dois métodos distintos: (i) equação da reta e (ii) teoria da complexação, conforme metodologia apresentada no item 3.2.4.

### 4.3.1 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

#### 4.3.1.1 Equação da reta

Um exemplo dos dados de calibração obtidos para a dosagem da concentração de  $\beta$ -CD é apresentado na Tabela 4.5 e Figura 4.4, sendo que a equação de ajuste obtida através de regressão linear entre a absorvância (Abs) e a concentração conhecida de  $\beta$ -CD (mmol), foi:

$$\text{Abs} = 1,538 - 1,418 \times [\beta\text{-CD}] \quad r^2 = 0,9975 \quad (4.3)$$

TABELA 4.5 Absorvâncias (Abs) obtidas para concentrações conhecidas de  $\beta$ -CD pelo método colorimétrico de dosagem da fenolftaleína (HAMON & MORAES, 1990).

Conc. de $\beta$ -CD (mmol)	0	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
Abs 550 nm	1,540	1,477	1,405	1,314	1,242	1,171	1,113	1,048	0,980

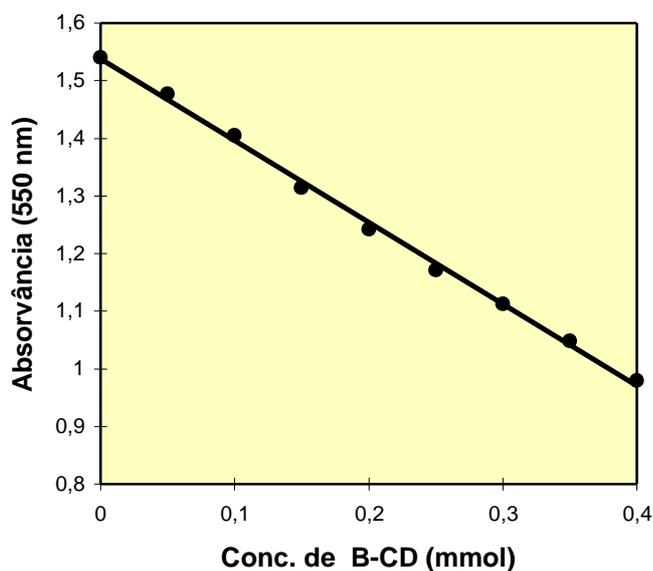


FIGURA 4.4 Curva padrão para dosagem de  $\beta$ -CD (mmol) pelo método colorimétrico da fenolftaleína (HAMON & MORAES, 1990).

#### 4.3.1.2 Teoria da complexação (HAMON & MORAES, 1990)

Os dados de calibração (Tabela 4.6) mostrados na Figura 4.5 obtidos para a determinação da concentração de  $\beta$ -CD, são linearizados (Tabela 4.7) e plotados na Figura 4.6 para determinação dos coeficientes linear e angular, o que possibilita a obtenção da equação 3.2.

TABELA 4.6 Absorvâncias (Abs) obtidas para concentrações conhecidas de  $\beta$ -CD pelo método colorimétrico da fenolftaleína (Determinação da equação de complexação para cálculo das concentrações de  $\beta$ -CD).  $Abs_0 = 1,541$ .

Conc. de $\beta$ -CD (mmol)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Abs. 550 nm	1,541	1,346	1,195	1,027	0,894	0,797	0,716	0,632	0,560	0,519	0,477

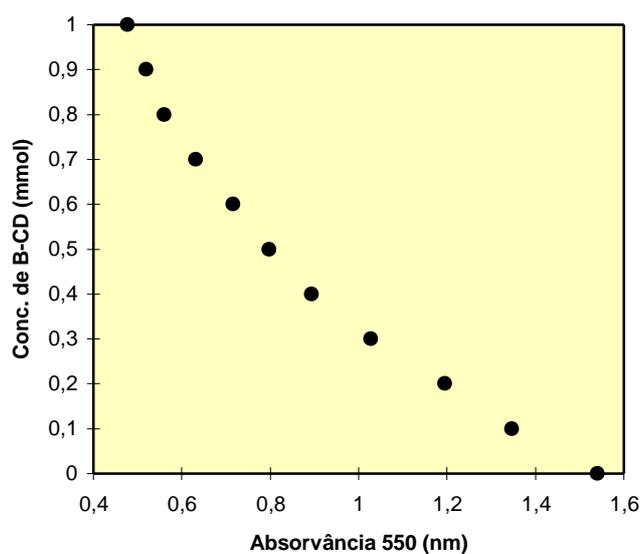


FIGURA 4.5 Curva padrão de  $\beta$ -CD (mmol) pela teoria da complexação (HAMON & MORAES, 1990).

TABELA 4.7 Relação entre  $Abs_o$ ,  $Abs$  e  $[\beta\text{-CD}]$  para determinação dos coeficientes linear e angular para obter a equação de determinação das concentrações de  $\beta$ -CD.

$\frac{[\beta\text{-CD}]}{1 - (Abs/Abs_o)}$	0,7903	0,8908	0,8994	0,9527	1,0356	1,1207	1,1867	1,2567	1,3570	1,4483
$Abs_o/Abs$	1,1449	1,2895	1,5005	1,7237	1,9335	2,1522	2,4383	2,7518	2,9692	3,2306

$$[\beta\text{-CD}] = \left[ 1 - \left( \frac{Abs}{Abs_o} \right) \right] \times \left\{ a + \left[ \frac{(Abs_o \times b)}{Abs} \right] \right\} \quad (3.2)$$

onde,

a - coeficiente linear;

b - coeficiente angular;

$Abs_o$  - absorvância a 550 nm na ausência de  $\beta$ -CD;

$Abs$  - absorvância a 550 nm das amostras;

$[\beta\text{-CD}]$  - concentração de  $\beta$ -ciclodextrina em mmol.

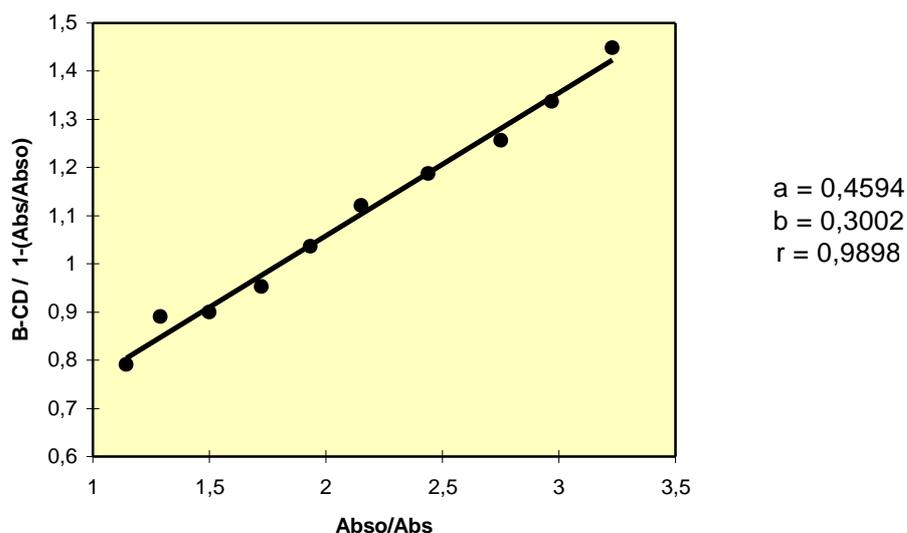


FIGURA 4.6 Equação da reta para determinação dos coeficientes linear e angular.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CGTase

A atividade da enzima CGTase foi determinada pela metodologia apresentada no item 3.2.5 e calculada a partir da equação 3.3.

$$A = (K \times V_R \times D) / V_{\text{Enz. dil.}} \quad (3.3)$$

onde,

A - atividade enzimática ( $\mu\text{mol min}^{-1}$  de Enz. estoque);

D - diluição da enzima;

K - inclinação da reta de conc. de CDs, em função do tempo ( $\text{mmol CD L}^{-1}.\text{min.}^{-1}$ );

$V_R$  - volume total de reação (neste teste 3 mL);

$V_{\text{enz. dil.}}$  - volume de enzima diluído (neste teste 1,5 mL).

##### 4.4.1 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Na Tabela 4.8 e Figura 4.7 apresenta-se a produção de  $\beta$ -CD em função do tempo de reação. A partir da equação 4.4, que representa esses dados, é possível calcular-se a atividade da enzima CGTase (A), que foi igual a  $0,083 \text{ mmol}\beta\text{-CD/min mL}$  Enz. estoque. Como a enzima apresentou um teor de proteína igual a  $0,9967 \text{ mg prot./mL}$  solução, tem-se uma atividade específica igual a  $83,27 \mu\text{mol/min.mg prot.}$

TABELA 4.8 Concentração de  $\beta$ -CD (mmol) produzida em função do tempo de reação (min.).

Tempo de reação (min)	5	10	15	20	25	30
$[\beta\text{-CD}]$ (mmol)	0,1036	0,1502	0,1967	0,2404	0,2750	0,3102

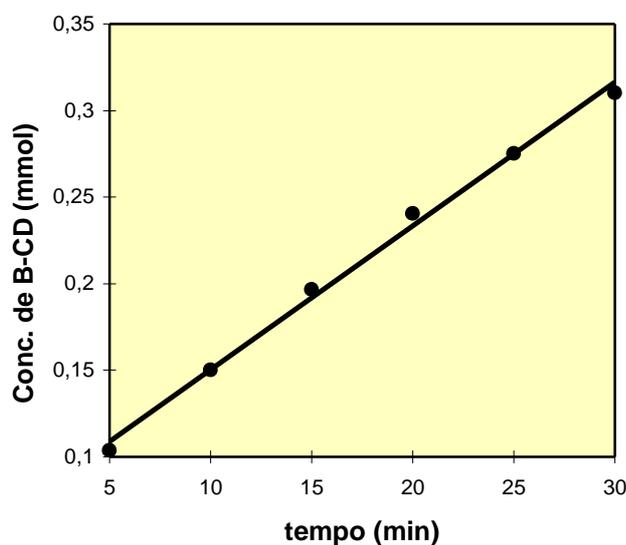


FIGURA 4.7 Concentração de  $\beta$ -CD (mmol) produzida em função do tempo de reação (min.).

A equação de ajuste é representada pela equação 4.4.

$$[\beta\text{-CD}] = 0,0676 + 0,0083 t \quad r^2 = 0,9954 \quad (4.4)$$

onde,

t - tempo (minutos)

#### 4.5 EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA CGTase

A influência do pH na atividade da CGTase foi determinada pela metodologia descrita no item 3.2.6.

##### 4.5.1 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Na Tabela 4.9 apresenta-se a atividade específica da enzima CGTase em função do pH da solução, sendo que estes resultados estão plotados na Figura 4.8.

TABELA 4.9 Atividade específica da CGTase em função do pH a 38 °C.

pH	5	6	7	8
Atividade (mmol/min.mg.prot.)	52,0	70,5	69,0	50,0

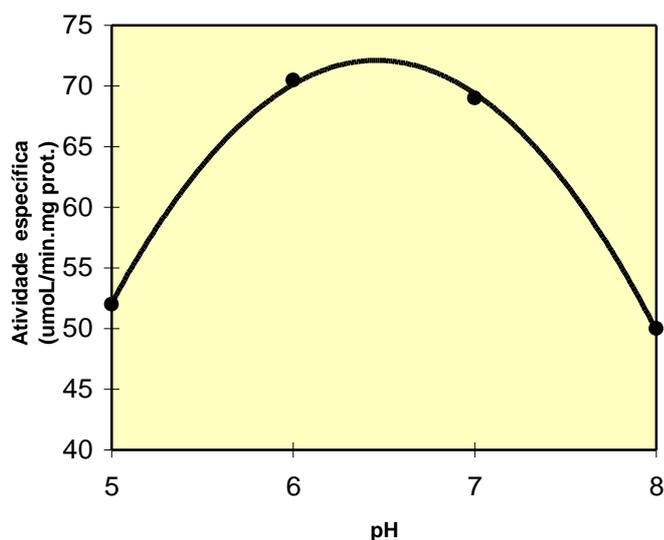


FIGURA 4.8 Atividade específica da CGTase em função do pH da solução, a 38°C.

#### 4.5.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Observa-se na Tabela 4.9 e Figura 4.8 que a atividade específica da CGTase em solução de amido (10% p/v) a 38°C apresenta um valor ótimo na faixa de pH entre 6,0 e 7,0, sendo que em pH 6,0 atinge um valor igual a 70,5  $\mu\text{mol}/\text{min mg prot.}$

Comparando-se os resultados deste ensaio com aqueles obtidos por HAMON & MORAES (1990), pode-se observar que os valores são bastante semelhantes, ou seja, a atividade máxima da enzima CGTase de *Bacillus alkalophilic* a pH 6,0 e 38°C está entre 6 e 7. No que se refere ao pH ótimo de outras CGTases, os valores encontrados na literatura variam conforme a natureza da CGTase. A Tabela 4.10 apresenta um resumo das características das CGTases produzidas por algumas espécies de *Bacillus*. Observa-se que existe CGTase, como a do *Bacillus sp* (ATCC 21783) que tem sua atividade ótima em pH relativamente ácido, entre 4,5 e 4,7 (NAKAMURA & HORIKOSHI, 1976). Outras, como no caso da CGTase produzida por *Bacillus subtilis*, apresenta maior atividade em pH alcalino, isto é, 8.

TABELA 4.10 Temperaturas e pH ótimos de CGTases produzidas por *Bacillus*

Microorganismos	pH ótimo	Temperatura ótima(°C)	Principal CD Produzida	Referências
<i>Bacillus macerans</i> (IFO-3490)	6,1-6,2	55	$\alpha$	SABIONI (1991)
<i>Bacillus megaterium</i>	5,2-6,2	55	$\beta$	SABIONI (1991)
<i>Bacillus</i> sp (ATCC-21783)	4,5-4,7	50	$\beta$	NAKAMURA & HORIKOSHI (1976)
<i>Bacillus coagulans</i>	6,5-8,5	65	$\beta$	KANEKO et al. (1990)
<i>Bacillus alkalophilic</i> 290-3	6,0-8,0	60	$\gamma$	ENGLBRECHT et al. (1990)
<i>B. thermoanaerobacter</i> sp	5	60	$\alpha$ e $\beta$	STARNES et al. (1990)
<i>Bacillus</i> sp BE -101	6,0-6,5	45	$\beta$	LEE & KIM (1991)
<i>Bacillus alkalophilic</i>	6,0-7,0	50	$\beta$	HAMON & MORAES (1990)
<i>Bacillus lentus</i>	6,5-8,5	45-55	$\beta$	SABIONI & PARK (1992)
<i>Bacillus alkalophilic</i> sp	5,5	50-55	$\alpha$	KOMETANI et al. (1994)
<i>Brevibacterium</i> sp	10	55	$\gamma$	MORI et al. (1994)

Nos ensaios de Fermentação e Ciclização Simultâneas adotou-se pH 6,0, pelo fato da enzima apresentar uma boa atividade específica, embora já se esteja numa situação onde a levedura não expressa sua atividade máxima (pH 4,0 - 4,5).

#### 4.6 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA CGTase NA PRODUÇÃO DE $\beta$ -CD

Neste ensaio, procurou-se determinar o volume de ciclodextrina glicosil transferase (CGTase) que conduziu a uma maior produção de  $\beta$ -ciclodextrina. O ensaio foi conduzido de acordo com a metodologia apresentada no item 3.2.7.

##### 4.6.1 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Foram testados vários volumes, sendo mostrados aqueles que apresentaram resultados mais representativos. Para uma mesma concentração de D.E. foram utilizados os volumes: 0,12; 0,24; 0,50; 0,75 e 1 mL de enzima CGTase.

A metodologia utilizada para preparação da solução de substrato foi a mesma descrita no item 3.2.3, enquanto o procedimento para diversos volumes de enzima encontram-se no item 3.2.7.

Na Tabela 4.11 mostra-se um resumo do ensaio relacionando o tempo de reação, as absorvâncias e as concentrações de  $\beta$ -CD obtidas pela teoria da complexação descrita no item 3.2.4, onde  $Abs_0 = 1,662$ . A Figura 4.9 mostra o comportamento da produção de  $\beta$ -CD em função do volume de CGTase.

TABELA 4.11 Concentração de  $\beta$ -CD (mmol) em função do volume de CGTase.  
Solução de amido com D.E. de 23,5, temperatura 38°C e pH 6,0.

Volume de enzima	0,12 mL		0,24 mL		0,50 mL		0,75 mL		1 mL	
tempo (min.)	550nm	[ $\beta$ -CD] (mmol)	550 nm	[ $\beta$ -CD] (mmol)						
10	1,599	0,2924	1,442	1,0656	1,404	1,2646	1,333	1,6504	1,240	2,1883
30	1,661	0,0045	1,540	0,5751	1,473	0,9077	1,420	1,1805	1,292	1,8826
60	1,575	0,4063	1,580	0,3824	1,435	1,1024	1,332	1,6560	1,310	1,7797
120	1,620	0,1939	1,456	0,9938	1,303	1,8195	1,179	2,5650	1,204	2,4075
180	1,564	0,4590	1,508	0,7323	1,421	1,1753	1,360	1,5015	1,275	1,9810
240	1,581	0,3777	1,499	0,7770	1,376	1,4146	1,363	1,4852	1,258	2,0809
300	1,489	0,8270	1,344	1,5894	1,261	2,0632	1,167	2,6418	1,111	3,0121
360	1,482	0,8622	1,390	1,3394	1,306	1,8025	1,320	1,7232	1,245	2,1583
400	1,476	0,8925	1,375	1,4200	1,282	1,9400	1,296	1,8596	1,236	2,2123
500	1,468	0,9330	1,369	1,4525	1,296	1,8596	1,287	1,9114	1,231	2,2426
600	1,474	0,9026	1,428	1,1388	1,310	1,7797	1,272	1,9986	1,242	2,1577
720	1,491	0,8170	1,381	1,3876	1,275	1,9810	1,278	1,9630	1,235	2,1994
800	1,475	0,8975	1,392	1,3287	1,301	1,8310	1,269	2,0161	1,245	2,1583
900	1,472	0,9127	1,369	1,4525	1,295	1,8653	1,265	2,0396	1,230	2,2486
1026	1,479	0,8773	1,352	1,5453	1,218	2,3213	1,070	3,2975	1,080	3,2268
1080	1,496	0,7920	1,397	1,3021	1,319	1,7289	1,250	2,1284	1,240	2,1883
1110	1,481	0,8672	1,405	1,2596	1,305	1,8082	1,264	2,0455	1,226	2,2726
1140	1,467	0,9381	1,415	1,2069	1,328	1,6783	1,272	1,9981	1,229	2,2547
1200	1,483	0,8572	1,399	1,2914	1,320	1,7233	1,268	2,0215	1,228	2,2608
1260	1,475	0,8975	1,397	1,3021	1,291	1,8881	1,268	2,0215	1,229	2,2547

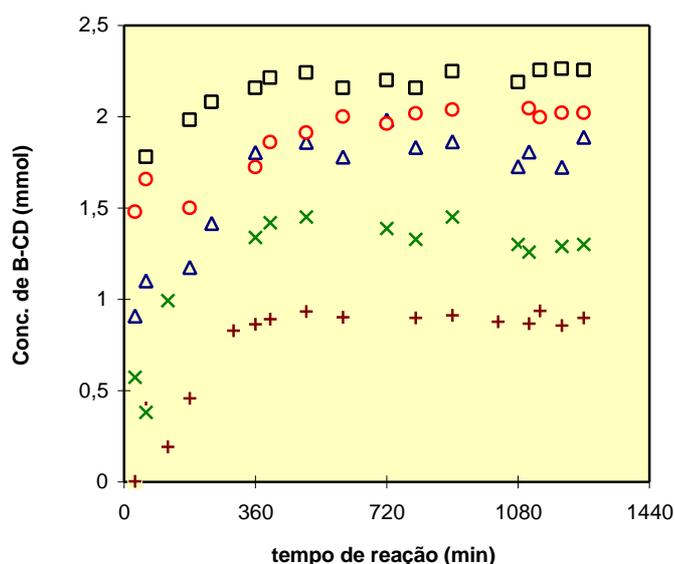


FIGURA 4.9 Produção de  $\beta$ -CD em função do volume de CGTase. Solução de amido com D.E. de 23,5 a 38°C, pH 6,0. (+) 0,12mL; (X) 0,24mL; (D) 0,50 mL; (O) 0,75 mL e (Y) 1 mL.

## 4.6.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Na Figura 4.9 apresenta-se a influência do volume de CGTase na produção de  $\beta$ -CD. Os resultados mostram um aumento progressivo da produção final de  $\beta$ -CD em função do volume de enzima. Os resultados deste ensaio, confirmam tendências observadas anteriormente, por diversos autores (HAMON & MORAES, 1990; MATTSSON et al., 1988). Observa-se na Figura 4.9 e Tabela 4.11, que após aproximadamente 6 horas de reação, atinge-se a produção máxima de  $\beta$ -CD obtida para cada volume de enzima utilizado, tendo-se alcançado um valor da ordem de 2,3 mmol quando se empregou 1 mL de CGTase nas condições de ensaio (38°C, pH 6,0, D.E. = 23,5). Esta quantidade é aproximadamente 5 vezes menor daquela obtida por HAMON & MORAES (1990) nas condições ótimas da enzima, 50°C e pH 8,0, e com uma atividade da ordem de 88  $\mu$ mol/min.mL determinada com solução de amido solúvel a 1% p/v. Nos ensaios de produção de  $\beta$ -CD, realizados por estes pesquisadores, utilizou-se uma solução de 10% p/v de dextrina (amido solúvel).

Com estes experimentos demonstrou-se que em pH 6,0 é possível produzir-se  $\beta$ -CD em temperaturas relativamente baixas (38°C), condições estas que permitem o emprego da levedura para consumo de glicose e maltose e produção de etanol.

## 4.7 INFLUÊNCIA DOS NUTRIENTES AUXILIADORES DA FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE $\beta$ -CD

A influência das fontes de fósforo e nitrogênio, elementos auxiliares indispensáveis à fermentação alcoólica, na produção de  $\beta$ -CD por CGTase, foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.8.

### 4.7.1 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Os ensaios foram realizados nas mesmas condições utilizadas para a produção de  $\beta$ -CD, ou seja, temperatura, pH, volume de enzima e tempo de reação respectivamente, 38°C; 6,0; 0,15 mL e 24 horas de reação.

As amostragens foram realizadas pelo método descrito no item 3.2.5. A  $\beta$ -CD produzida foi determinada conforme metodologia apresentada no item 3.2.4.

Os valores da concentração de  $\beta$ -CD foram calculados utilizando a teoria da complexação apresentada no item 4.3, onde  $Abs_0$  foi igual 1,672.

Na Tabela 4.12 apresenta-se os resultados obtidos para as concentrações de  $\beta$ -CD em função do tempo de reação. Estes resultados são plotados na Figura 4.10.

TABELA 4.12 Concentração de  $\beta$ -CD (mmol) em função do tempo de reação, para solução de amido com D.E.= 24,32, na presença e na ausência de nutrientes.

tempo (min)	CGTase		CGTase + nutrientes	
	Abs. 550 nm	[ $\beta$ -CD] (mmol)	Abs.550 nm	[ $\beta$ -CD] (mmol)
0	1,672	0,0000	1,672	0,0000
15	1,642	0,1372	1,622	0,2306
30	1,627	0,2066	1,648	0,1103
45	1,617	0,2531	1,628	0,2026
60	1,626	0,2112	1,637	0,1608
75	1,598	0,3422	1,618	0,2485
90	1,592	0,3706	1,618	0,2485
105	1,596	0,3517	1,637	0,1608
120	1,602	0,3234	1,623	0,2159
150	1,597	0,3470	1,624	0,2205
180	1,586	0,3989	1,610	0,2860
270	1,560	0,5231	1,593	0,3650
300	1,591	0,3753	1,583	0,4138
380	1,558	0,5328	1,594	0,3611
420	1,552	0,5618	1,567	0,4895
480	1,552	0,5618	1,564	0,5041
510	1,535	0,6442	1,572	0,4656
540	1,529	0,6735	1,560	0,5232
665	1,535	0,6442	1,548	0,5811
695	1,540	0,6199	1,541	0,6150
720	1,526	0,6882	1,541	0,6150
750	1,539	0,6247	1,488	0,8760
780	1,543	0,6053	1,532	0,6589
850	1,537	0,6589	1,534	0,6496
950	1,535	0,6442	1,538	0,6300
1240	1,531	0,6378	1,536	0,6393
1260	1,533	0,6540	1,533	0,6540
1380	1,532	0,6588	1,535	0,6444
1440	1,533	0,6540	1,533	0,6540

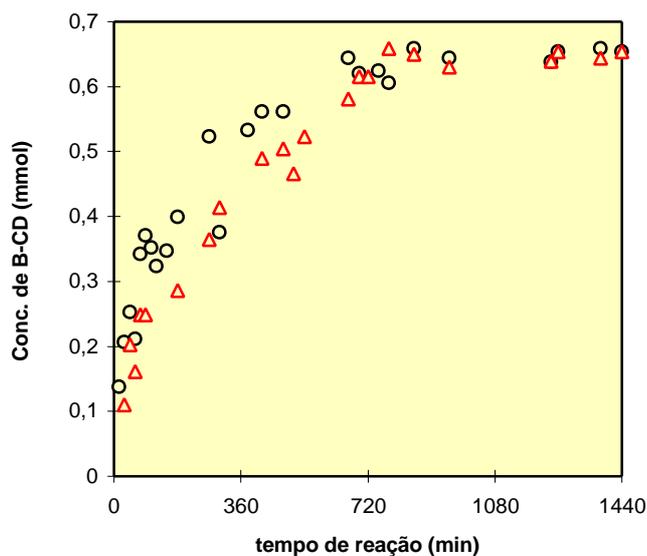


FIGURA 4.10 Concentração de  $\beta$ -CD (mmol) em função do tempo de reação para a solução de amido liquefeito com D.E. = 24,32 na presença e na ausência de nutrientes. (●) CGTase e (▲) CGTase + Nutrientes.

#### 4.7.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Observando-se a Tabela 4.12 e Figura 4.10, pode-se notar que os nutrientes praticamente não influenciam na produção de  $\beta$ -ciclodextrina, ou seja, a concentração final de  $\beta$ -CD obtida na presença e na ausência dos nutrientes é da mesma ordem de grandeza, demonstrando que estes não apresentam um efeito inibidor à atividade da CGTase.

#### 4.8 EFEITO DO ETANOL NA PRODUÇÃO DE $\beta$ -CD

Vários trabalhos têm mostrado um aumento na produção de  $\beta$ -CD obtidos por CGTase quando o meio contém solventes orgânicos, como por exemplo etanol, conforme apresentado no item 2.5.8.

#### 4.8.1 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Os ensaios que objetivaram determinar a produção de  $\beta$ -CD na presença de etanol, foram realizados a 38°C, pH 6,0 e 0,15 mL de CGTase, com soluções de amido com dextrose equivalente (D.E.) iguais a 12,02 e 21,81, conforme metodologia descrita no item 3.2.9.

Na Tabela 4.13 e Figura 4.11 são apresentadas as concentrações de  $\beta$ -CD (mmol) em função do tempo de reação. Os valores de  $\beta$ -CD foram calculados utilizando a teoria da complexação conforme apresentado no item 3.2.4, onde Abs<sub>o</sub> foi igual a 1,541, na equação 3.2.

TABELA 4.13 Concentração de  $\beta$ -CD em função do tempo de reação na ausência e presença do etanol para soluções de amido com D.E. de 12,02 e 21,81.

tempo (min.)	D.E. = 12,02		D.E. = 21,81	
	[ $\beta$ -CD] (mmol)		[ $\beta$ -CD] (mmol)	
	Etanol (5% v/v)	s/ Etanol	Etanol (5% v/v)	s/ Etanol
0	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,260	0,611	0,189	0,090
30	0,663	0,655	0,234	0,180
45	0,485	0,787	0,184	0,259
60	0,542	0,527	0,148	0,159
90	0,542	0,595	0,189	0,180
120	0,616	0,824	0,259	0,230
150	0,275	0,873	0,326	0,326
180	0,279	0,873	0,350	0,315
360	1,483	1,471	0,500	0,685
420	1,448	1,525	0,580	0,770
485	1,777	1,662	0,892	0,770
540	1,913	1,674	0,798	0,880
595	0,900	0,717	1,578	1,869
760	2,089	1,710	1,088	0,733
900	2,477	1,826	1,297	0,819
1413	3,042	1,777	1,674	0,819
1440	3,206	1,777	1,608	0,803

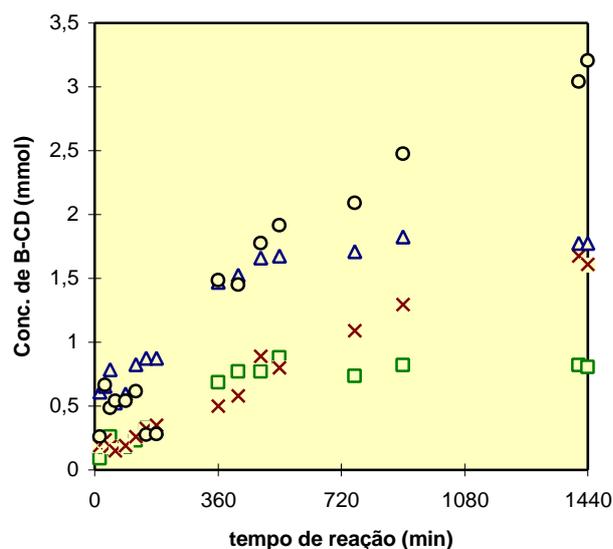


FIGURA 4.11 Produção de  $\beta$ -CD em função do tempo de reação na ausência e na

presença de etanol, e com soluções de amido com D.E. = 12,02 e 21,81.

(●) D.E. = 12,02 + etanol (5% p/v); (◐) D.E. = 12,02 sem etanol; (×)

(◑) D.E. = 21,81 + etanol (5% p/v); (●) D.E. = 21,81 sem etanol

#### 4.8.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Observando-se a Figura 4.11 e Tabela 4.13 verifica-se que o etanol atua no sentido de aumentar a produção de  $\beta$ -CD, corroborando os resultados encontrados por LEE & KIM (1991) e MATTSSON et al. (1991). Pode-se notar que, nas duas concentrações de D.E. utilizadas, em 24 horas de reação, produz-se praticamente 2 vezes mais  $\beta$ -CD no meio contendo etanol em relação àquele onde não se adicionou este solvente (3,21 versus 1,78 mmol e 1,68 versus 0,82 mmol, respectivamente para D.E. = 12,02 e 21,81).

Nota-se também na Figura 4.11, que em ambos os casos, a produção de  $\beta$ -CD diminuiu com o aumento do grau de hidrólise da solução de amido liquefeito. Para um aumento de 55% na D.E., obteve-se aproximadamente 46% menos  $\beta$ -CD, indicando que existe um compromisso entre o grau de hidrólise da solução de amido e a produção de  $\beta$ -ciclodextrina. Estudos nesse sentido devem ser realizados a fim de se obter a condição de máxima produção em função da concentração de amido.

#### 4.9 PRODUÇÃO DE $\beta$ -CD POR FERMENTAÇÃO E CICLIZAÇÃO SIMULTÂNEAS (F.C.S.)

Apresenta-se a seguir os resultados obtidos nos experimentos de produção de  $\beta$ -ciclodextrina por Fermentação e Ciclização Simultâneas (F.C.S.). Estes ensaios foram realizados de acordo com a metodologia apresentada no item 3.2.10.

##### 4.9.1 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Nas Tabelas 4.14 e 4.15 e Figuras 4.12 e 4.13 apresenta-se os resultados obtidos para a produção de  $\beta$ -CD com CGTase na presença e ausência de 3 e 5% v/v de etanol e por Fermentação e Ciclização Simultâneas (F.C.S.), para soluções de amido com D.E. de 22,3 e 24,32, respectivamente. Foram utilizados 0,12 mL de CGTase e a concentração de  $\beta$ -CD (mmol) foi calculada utilizando a teoria da complexação conforme metodologia descrita no item 3.2.4, e obtidas a partir das equações 4.5 e 4.6.

Os resultados dos ensaios de F.C.S. realizados com 0,50 mL de solução de enzima CGTase, diferentes concentrações de etanol (1, 3 e 5 % v/v) e soluções de amido com D.E. compreendidos entre, aproximadamente, 2 e 25, são apresentados nas Tabelas 4.16 a 4.21 e Figuras 4.13 a 4.18. As concentrações de  $\beta$ -ciclodextrinas ( $\beta$ -CD), calculadas pela teoria da complexação, foram obtidas a partir das equações 4.7 a 4.12.

$$[\mathbf{b} - CD] = \left[ 1 - \left( \frac{Abs}{1,541} \right) \right] \times \left\{ 0,4595 + \left[ \frac{(0,4626)}{Abs} \right] \right\} \quad (4.5)$$

$$[\mathbf{b} - CD] = \left[ 1 - \left( \frac{Abs}{1,672} \right) \right] \times \left\{ 0,4595 + \left[ \frac{(0,5019)}{Abs} \right] \right\} \quad (4.6)$$

$$[\mathbf{b} - CD] = \left[ 1 - \left( \frac{Abs}{1,712} \right) \right] \times \left\{ 0,4595 + \left[ \frac{(0,5139)}{Abs} \right] \right\} \quad (4.7)$$

$$[\mathbf{b} - CD] = \left[ 1 - \left( \frac{Abs}{1,618} \right) \right] \times \left\{ 0,4595 + \left[ \frac{(0,4857)}{Abs} \right] \right\} \quad (4.8)$$

$$[\mathbf{b} - CD] = \left[ 1 - \left( \frac{Abs}{1,657} \right) \right] \times \left\{ 0,4595 + \left[ \frac{(0,4974)}{Abs} \right] \right\} \quad (4.9)$$

$$[\mathbf{b} - CD] = \left[ 1 - \left( \frac{Abs}{1,622} \right) \right] \times \left\{ 0,4595 + \left[ \frac{(0,4869)}{Abs} \right] \right\} \quad (4.10)$$

$$[b-CD] = \left[ 1 - \left( \frac{Abs}{1,559} \right) \right] \times \left\{ 0,4595 + \left[ \frac{(0,4680)}{Abs} \right] \right\} \quad (4.11)$$

$$[b-CD] = \left[ 1 - \left( \frac{Abs}{1,646} \right) \right] \times \left\{ 0,4595 + \left[ \frac{(0,4941)}{Abs} \right] \right\} \quad (4.12)$$

O percentual de etanol produzido nos ensaios de Fermentação e Ciclização Simultâneas (F.C.S.) é mostrado na Tabela 4.22, sendo que os cromatogramas são apresentados no Anexo 8.2.

TABELA 4.14 Concentração de  $\beta$ -CD na ausência e presença de 3% v/v de etanol e por

F.C.S. Solução de amido com D.E. = 22,3; 38°C e pH = 6,0;  
volume de CGTase = 0,12 mL.

tempo (min.)	CGTase		CGTase + 3% v/v Etanol		F.C.S.	
	550 nm	[b-CD](mmol)	550 nm	[b-CD](mmol)	550 nm	[b-CD](mmol)
15	1,497	0,219	1,481	0,300	1,545	0,000
30	1,494	0,230	1,522	0,094	1,541	0,000
45	1,486	0,270	1,462	0,397	1,540	0,004
60	1,490	0,250	1,483	0,290	1,546	0,000
75	1,494	0,230	1,483	0,290	1,539	0,009
90	1,482	0,290	1,467	0,372	1,539	0,009
105	1,473	0,340	1,454	0,439	1,538	0,014
120	1,497	0,219	1,472	0,346	1,538	0,014
150	1,480	0,305	1,458	0,418	1,537	0,019
180	1,467	0,372	1,448	0,470	1,535	0,296
205	1,480	0,305	1,459	0,413	1,523	0,089
270	1,470	0,356	1,465	0,382	1,498	0,214
300	1,463	0,396	1,432	0,553	1,489	0,259
365	1,440	0,511	1,436	0,532	1,466	0,377
420	1,451	0,454	1,429	0,569	1,428	0,574
480	1,468	0,366	1,448	0,470	1,396	0,744
540	1,459	0,413	1,436	0,532	1,390	0,776
630	1,446	0,480	1,414	0,648	1,342	1,038
660	1,459	0,413	1,402	0,712	1,336	1,071
750	1,441	0,506	1,385	0,803	1,311	1,212
775	1,450	0,459	1,396	0,744	1,311	1,212
895	1,425	0,590	1,376	0,851	1,276	1,413
1298	1,438	0,522	1,315	1,189	*	*
1320	1,423	0,600	1,321	1,155	*	*

TABELA 4.15 Concentração de  $\beta$ -CD na ausência e presença de 5% v/v de etanol e por

F.C.S. Solução de amido com D.E. = 24,32; 38°C e pH = 6,0;

volume de CGTase = 0,12 mL.

tempo (min.)	CGTase		CGTase + Etanol 5 % v/v		F.C.S.	
	550 nm	[ $\beta$ -CD ](mmol)	550 nm	[ $\beta$ -CD ](mmol)	550 nm	[ $\beta$ -CD ](mmol)
15	1,642	0,137	1,645	0,123	1,670	0,009
30	1,627	0,206	1,615	0,262	1,669	0,013
45	1,617	0,253	1,627	0,206	1,665	0,031
60	1,626	0,211	1,617	0,253	1,658	0,063
75	1,598	0,342	1,614	0,267	1,655	0,075
90	1,592	0,370	1,619	0,243	1,658	0,063
105	1,596	0,351	1,615	0,262	1,656	0,072
120	1,602	0,323	1,623	0,225	1,670	0,009
150	1,597	0,347	1,620	0,239	1,646	0,118
180	1,586	0,399	1,604	0,314	1,631	0,188
270	1,560	0,523	1,593	0,365	1,631	0,188
300	1,591	0,375	1,576	0,446	1,592	0,370
380	1,558	0,532	1,551	0,566	1,555	0,547
420	1,552	0,561	1,544	0,600	1,537	0,634
480	1,552	0,561	1,541	0,615	1,522	0,708
510	1,535	0,644	1,543	0,605	1,493	0,851
540	1,529	0,673	1,536	0,639	1,484	0,896
665	1,535	0,644	1,492	0,856	1,439	1,125
695	1,540	0,620	1,508	0,777	1,442	1,110
720	1,526	0,688	1,502	0,806	1,422	1,214
750	1,539	0,624	1,499	0,821	1,425	1,199
780	1,543	0,605	1,480	0,917	1,415	1,251
850	1,5368	0,635	1,467	0,982	1,385	1,410
950	1,5359	0,640	1,448	1,079	1,377	1,453
1240	1,531	0,663	1,412	1,267	1,352	1,589
1260	1,533	0,654	1,412	1,267	1,348	1,611
1380	1,532	0,659	1,427	1,188	1,350	1,600
1440	1,533	0,654	1,416	1,246	1,349	1,606

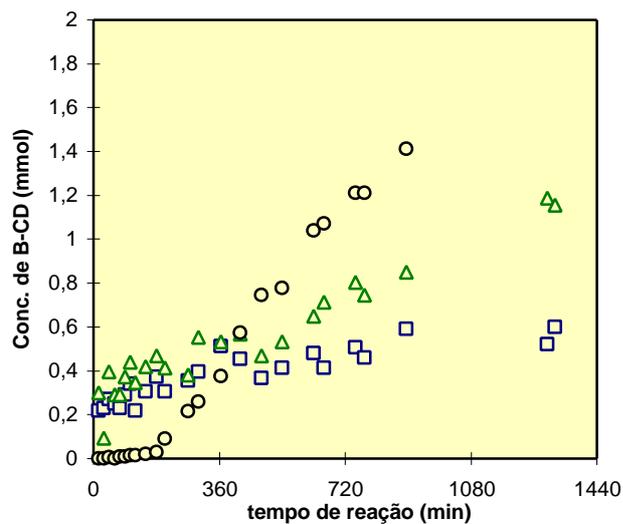


FIGURA 4.12 Concentração de  $\beta$ -CD (mmol) com 0,12 mL de CGTase, solução de amido com D.E. = 22,30; 38°C e pH 6,0; (■) 3% v/v de etanol; (●) F.C.S. e (▲) ausência de etanol.

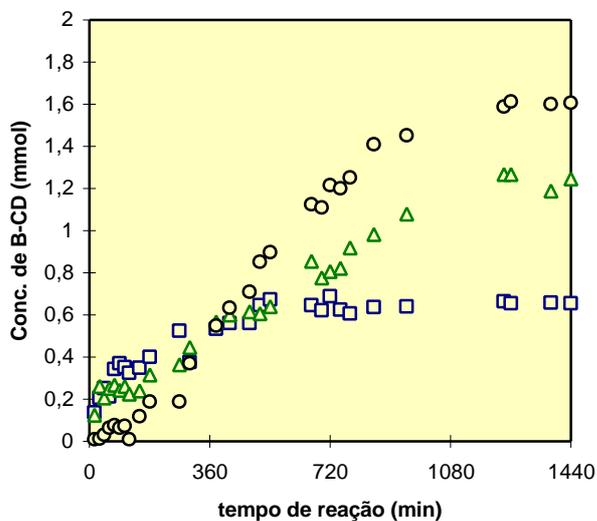


FIGURA 4.13 Concentração de  $\beta$ -CD (mmol) com 0,12 mL de CGTase, solução de amido com D.E. = 24,32; 38°C e pH 6,0; (■) 5% v/v de etanol; (●) F.C.S. e (▲) ausência de etanol.

TABELA 4.16 Concentração de  $\beta$ -CD na ausência e presença de 1% v/v de etanol e por F.C.S. Solução de amido com D.E. = 2,69; 38°C e pH = 6,0; volume de CGTase = 0,50 mL.

tempo (min.)	CGTase		CGTase + Etanol (1 % v/v)		F.C.S.	
	550 nm	[ $\beta$ -CD](mmol)	550 nm	[ $\beta$ -CD](mmol)	550 nm	[ $\beta$ -CD](mmol)
15	0,930	4,622	0,996	4,079	1,505	0,968
30	0,904	4,851	0,877	5,099	1,390	1,558
45	0,760	6,315	0,674	7,408	1,294	2,091
60	0,758	6,338	0,755	6,373	1,212	2,580
90	0,671	7,450	0,589	8,737	1,129	3,114
120	0,618	8,250	0,632	8,028	0,991	4,119
165	0,744	6,503	0,707	6,964	0,888	4,997
240	0,629	8,075	0,522	10,037	0,810	5,763
270	0,602	8,514	0,560	9,266	0,709	6,938
300	0,486	10,862	0,413	12,927	0,748	6,455
360	0,689	7,920	0,568	9,116	0,735	6,612
420	0,652	7,725	0,551	9,441	0,696	7,108
480	0,629	8,075	0,537	9,721	0,689	7,202
540	0,634	7,997	0,509	10,323	0,594	8,654
600	0,588	8,754	0,535	9,762	0,638	7,935
690	0,565	9,172	0,505	10,414	0,541	9,640
810	0,576	8,969	0,489	10,789	0,505	10,414
1050	0,571	9,060	0,523	10,015	0,508	10,346
1080	0,570	9,079	0,505	10,444	0,520	10,080
1110	0,563	9,210	0,476	11,111	0,563	9,210
1140	0,566	9,153	0,498	10,575	0,527	9,930
1350	0,577	8,950	0,500	10,529	0,530	9,866
1380	0,588	8,754	0,481	10,986	0,551	9,441
1440	0,590	8,719	0,478	11,061	0,560	9,266

TABELA 4.17 Concentração de  $\beta$ -CD na ausência e presença de 3% v/v de etanol e por F.C.S. Solução de amido com D.E. = 3,30; 38°C e pH = 6,0; volume de CGTase = 0,50 mL.

tempo (min.)	CGTase		CGTase + Etanol (3 % v/v)		F.C.S.	
	550 nm	[ $\beta$ -CD](mmol)	550 nm	[ $\beta$ -CD](mmol)	550 nm	[ $\beta$ -CD](mmol)
15	0,609	7,839	0,655	7,148	1,274	1,787
30	0,547	8,918	0,538	9,093	1,257	1,887
60	0,602	7,952	0,641	7,349	1,082	3,009
90	0,525	9,353	0,535	9,151	0,982	3,750
120	0,410	12,275	0,429	11,696	0,905	4,389
180	0,472	10,543	0,453	11,028	0,821	5,177
315	0,442	11,326	0,416	12,087	0,661	7,063
360	0,436	11,495	0,391	12,904	0,614	7,759
420	0,442	11,326	0,429	11,696	0,564	8,603
480	0,442	11,326	0,401	12,566	0,558	8,712
540	0,446	11,215	0,397	12,699	0,522	9,415
630	0,446	11,215	0,415	12,118	0,488	10,160
660	0,451	11,080	0,420	11,964	0,492	10,067
690	0,451	11,080	0,413	12,180	0,483	10,277
720	0,464	10,742	0,421	11,934	0,473	10,518
871	0,494	10,022	0,407	12,370	0,432	11,609
900	0,462	10,794	0,402	12,533	0,426	11,784
940	0,473	10,518	0,402	12,533	0,416	12,087
960	0,465	10,717	0,442	11,326	0,397	12,699
1320	0,458	10,897	0,382	13,222	0,442	11,326
1350	0,444	11,270	0,361	14,022	0,434	11,551
1380	0,444	11,270	0,352	14,391	0,410	12,276
1410	0,453	11,028	0,347	14,604	0,442	11,326
1440	0,436	11,494	0,345	14,691	0,435	11,523

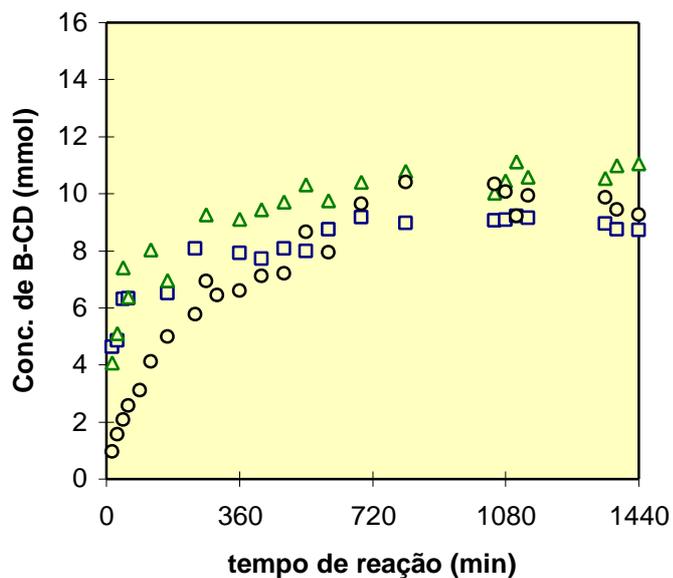


FIGURA 4.14 Concentração de  $\beta$ -CD (mmol) com 0,50 mL de CGTase, solução de amido com D.E. = 2,69; 38°C e pH 6,0. (D) 1% v/v de etanol; (O) F.C.S.; e (D) ausência de etanol.

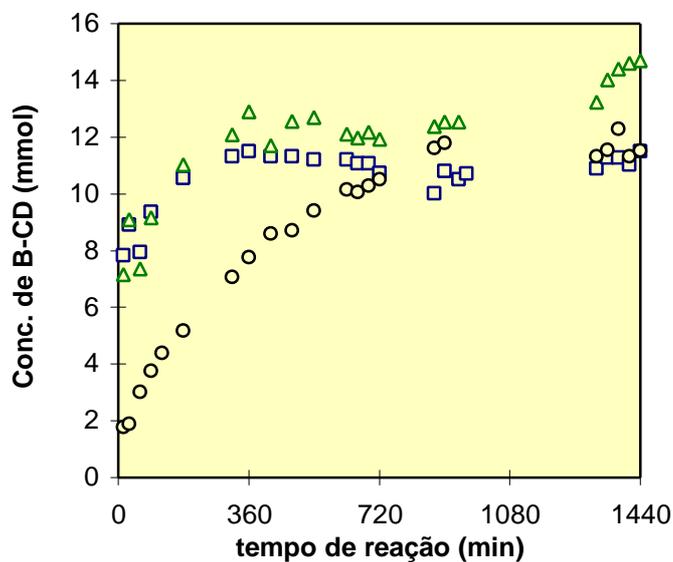


FIGURA 4.15 Concentração de  $\beta$ -CD (mmol) com 0,50 mL de CGTase, solução de amido com D.E. = 3,30; 38°C e pH 6,0. (D) 3% v/v de etanol; (O) F.C.S. e (D) ausência de etanol.

TABELA 4.18 Concentração de  $\beta$ -CD na ausência e presença de 3% v/v de etanol e por F.C.S. Solução de amido com D.E. = 6,93; 38°C e pH = 6,0; volume de CGTase = 0,50 mL.

tempo (min.)	CGTase		CGTase + Etanol (3 % v/v)		F.C.S.	
	550 nm	[ $\beta$ -CD](mmol)	550 nm	[ $\beta$ -CD](mmol)	550 nm	[ $\beta$ -CD](mmol)
15	1,052	3,403	1,063	3,324	1,513	0,685
30	1,151	2,723	0,997	3,817	1,450	1,002
60	1,023	3,618	1,045	3,454	1,299	1,820
90	1,048	3,432	1,032	3,550	1,209	2,354
120	0,977	3,974	0,821	5,375	1,141	2,788
248	0,836	5,223	0,774	5,872	0,891	4,704
300	0,749	6,157	0,664	7,242	0,816	5,425
363	0,747	6,179	0,656	7,356	0,747	6,179
420	0,812	5,466	0,653	7,399	0,710	6,630
480	0,723	6,467	0,599	8,235	0,675	7,089
562	0,723	6,467	0,522	9,674	0,619	7,912
600	0,712	6,604	0,606	8,119	0,632	7,710
768	0,739	6,274	0,567	8,793	0,603	8,169
790	0,715	6,566	0,576	8,630	0,639	7,605
904	0,732	6,537	0,582	8,524	0,519	9,737
915	0,724	6,454	0,577	8,612	0,568	8,775
1050	0,718	6,529	0,574	8,666	0,560	8,922
1120	0,715	6,566	0,570	8,738	0,541	9,287
1260	0,705	6,693	0,576	8,631	0,523	9,653
1320	0,720	6,504	0,569	8,756	0,536	9,386
1350	0,722	6,480	0,618	7,927	0,533	9,447
1380	0,714	6,579	0,567	8,793	0,529	9,528
1440	0,720	6,504	0,570	8,738	0,530	9,508

TABELA 4.19 Concentração de  $\beta$ -CD na ausência e presença de 5% v/v de etanol e por F.C.S. Solução de amido com D.E. = 9,87; 38°C e pH = 6,0; volume de CGTase = 0,50 mL.

tempo (min.)	CGTase		CGTase + Etanol (5 % v/v)		F.C.S.	
	550 nm	[ $\beta$ -CD] (mmol)	550 nm	[ $\beta$ -CD] (mmol)	550 nm	[ $\beta$ -CD] (mmol)
15	0,960	3,945	1,063	3,162	1,508	0,549
30	1,057	3,204	1,127	2,720	1,427	0,962
60	1,103	2,882	1,044	3,299	1,274	1,805
125	0,866	4,761	0,834	5,068	1,089	2,979
150	0,789	5,529	0,779	5,636	1,043	3,307
180	0,846	4,951	0,830	5,107	0,982	3,768
260	0,812	5,289	0,739	6,088	0,907	4,391
427	0,656	7,156	0,607	7,894	0,778	5,647
450	0,695	6,629	0,632	7,506	0,770	5,735
480	0,606	7,911	0,607	7,894	0,755	5,767
520	0,702	6,540	0,602	7,975	0,730	6,194
680	0,698	6,591	0,596	8,074	0,696	6,617
720	0,688	6,721	0,550	8,887	0,681	6,813
850	0,690	6,694	0,527	9,339	0,640	7,387
932	0,682	6,800	0,508	9,738	0,619	7,705
960	0,684	6,773	0,504	9,826	0,596	8,073
992	0,680	6,827	0,504	9,826	0,586	8,241
1020	0,701	6,552	0,519	9,504	0,593	8,124
1080	0,688	6,720	0,499	9,936	0,570	8,519
1140	0,605	7,927	0,511	9,673	0,579	8,362
1200	0,670	6,962	0,508	9,738	0,581	8,327
1260	0,664	7,044	0,504	9,826	0,571	8,502
1333	0,674	6,907	0,508	9,788	0,577	8,396
1380	0,692	6,668	0,480	10,377	0,566	8,592
1440	0,682	6,800	0,464	10,772	0,612	7,815

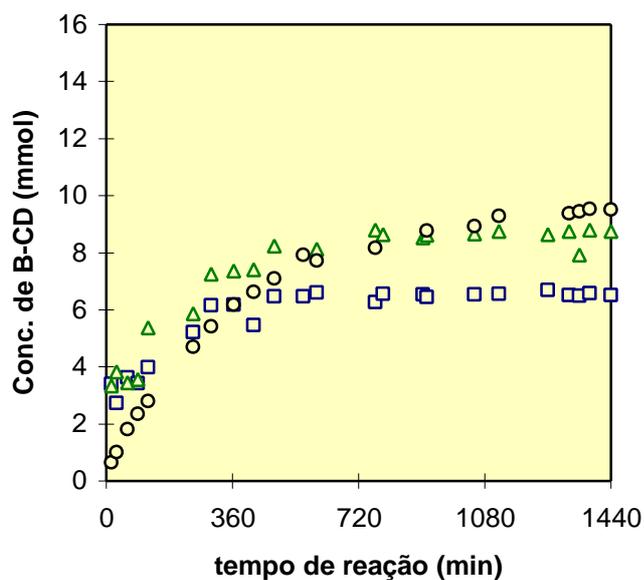


FIGURA 4.16 Concentração de  $\beta$ -CD (mmol) com 0,50 mL de CGTase, solução de amido com D.E. = 6,93; 38°C e pH 6,0. (■) 3% v/v de etanol; (●) F.C.S.; e (▲) ausência de etanol.

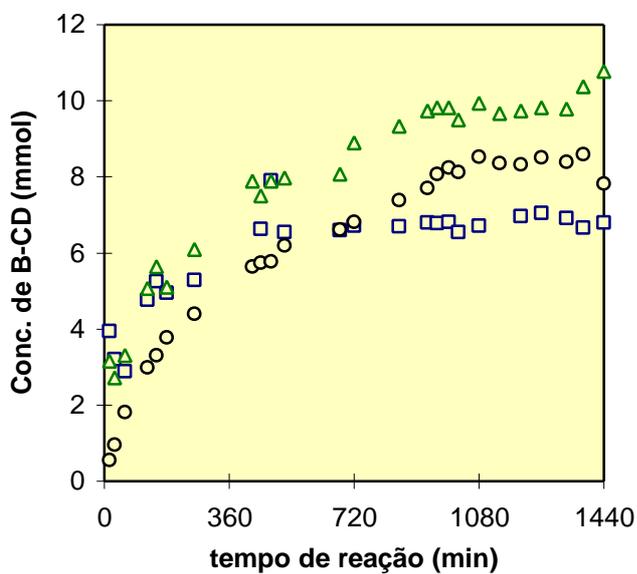


FIGURA 4.17 Concentração de  $\beta$ -CD (mmol) com 0,50 mL de CGTase, solução de amido com D.E. = 9,87; 38°C e pH 6,0. (■) 5% v/v de etanol; (●) F.C.S. e (▲) ausência de etanol.

TABELA 4.20 Concentração de  $\beta$ -CD na ausência e presença de 5% v/v de etanol e por F.C.S. Solução de amido com D.E. = 17,18; 38°C e pH = 6,0; volume de CGTase = 0,50 mL.

tempo (min.)	CGTase		CGTase + Etanol (5 % v/v)		F.C.S.	
	550 nm	[ $\beta$ -CD](mmol)	550 nm	[ $\beta$ -CD](mmol)	550 nm	[ $\beta$ -CD](mmol)
15	1,218	1,845	1,171	2,138	1,541	0,088
30	1,189	2,024	1,154	2,247	1,522	0,182
45	1,045	2,991	1,190	2,018	1,488	0,352
60	1,222	1,821	1,273	1,517	1,462	0,485
90	1,074	2,785	1,031	3,093	1,426	0,671
120	1,278	1,488	1,144	2,312	1,376	0,938
180	1,065	2,848	1,070	2,813	1,316	1,270
240	0,941	3,792	0,986	3,433	1,269	1,540
300	0,982	3,464	0,986	3,433	1,233	1,754
360	1,001	3,318	0,945	3,760	1,193	1,999
450	1,010	3,249	1,002	3,310	1,119	2,477
480	1,075	1,778	0,977	3,503	1,102	2,591
540	1,190	2,018	0,968	3,574	1,059	2,891
600	1,187	2,037	1,046	2,984	1,040	3,027
720	1,136	2,364	0,989	3,410	0,942	3,784
780	1,111	2,530	0,958	3,654	0,922	3,951
840	1,148	2,286	0,940	3,801	0,888	4,246
1200	1,152	2,260	0,938	3,817	0,807	5,013
1230	1,156	2,234	0,855	4,546	0,795	5,136
1260	1,141	2,331	0,920	3,968	0,778	5,315
1320	1,146	2,299	0,947	3,743	0,788	5,209
1350	1,133	2,384	0,864	3,463	0,801	5,074
1380	1,133	2,384	0,862	4,481	0,789	5,199
1440	1,160	2,208	0,870	4,408	0,766	5,445

TABELA 4.21 Concentração de  $\beta$ -CD na ausência e presença de 5% v/v de etanol e por F.C.S. Solução e amido com D.E. = 22,20; 38°C e pH = 6,0; volume de CGTase = 0,50 mL.

tempo (min.)	CGTase		CGTase + Etanol (5 % v/v)		F.C.S.	
	550 nm	[ $\beta$ -CD] (mmol)	550 nm	[ $\beta$ -CD] (mmol)	550 nm	[ $\beta$ -CD] (mmol)
15	1,437	1,020	1,421	1,103	1,613	0,153
30	1,471	0,845	1,443	0,988	1,613	0,153
60	1,377	1,337	1,339	1,219	1,598	0,224
90	1,373	1,358	1,333	1,578	1,570	0,357
120	1,484	0,779	1,441	0,999	1,538	0,512
180	1,363	1,413	1,349	1,489	1,489	0,754
240	1,275	1,909	1,342	1,528	1,432	1,046
300	1,308	1,719	1,297	1,782	1,412	1,150
360	1,264	1,973	1,242	2,104	1,385	1,294
420	1,311	1,702	1,242	2,104	1,315	1,679
640	1,305	1,736	1,183	2,467	1,203	2,342
660	1,308	1,719	1,238	2,128	1,147	2,698
710	1,301	1,759	1,258	2,008	1,188	2,435
770	1,310	1,707	1,190	2,423	1,166	2,575
885	1,290	1,822	1,239	2,122	1,067	3,245
950	1,271	1,932	1,242	2,104	1,056	3,324
1020	1,322	1,640	1,228	2,188	1,048	3,382
1120	1,300	1,764	1,230	2,176	1,031	3,507
1180	1,291	1,816	1,225	2,206	1,025	3,552
1260	1,313	1,690	1,149	2,685	1,016	3,620
1290	1,286	1,845	1,218	2,249	1,011	3,658
1320	1,290	1,822	1,217	2,255	1,053	3,345
1380	1,310	1,707	1,209	2,304	1,009	3,673
1440	1,279	1,885	1,185	2,454	1,001	3,734

TABELA 4.22 Porcentual de etanol obtido nos ensaios de Fermentação e Ciclização Simultâneas (F.C.S.).

ENSAIO	1	2	3	4	5	6	7	8
VOLUME DE CGTase ADICIONADO	0,12 mL		0,50 mL					
D.E.	22,30	24,32	2,69	3,30	6,93	9,87	17,18	22,20
PORCENTUAL DE ETANOL DA F.C.S.	1,5446	2,1801	0,8443	1,0373	1,1819	0,8620	1,5290	1,6856

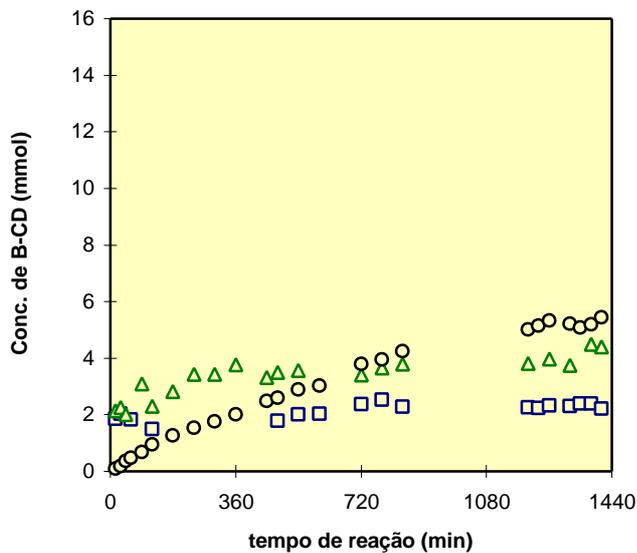


FIGURA 4.18 Concentração de  $\beta$ -CD (mmol) com 0,50 mL de CGTase, solução de amido com D.E. = 17,18; 38°C e pH 6,0. (■) 5% v/v de etanol; (○) F.C.S. e (△) ausência de etanol.

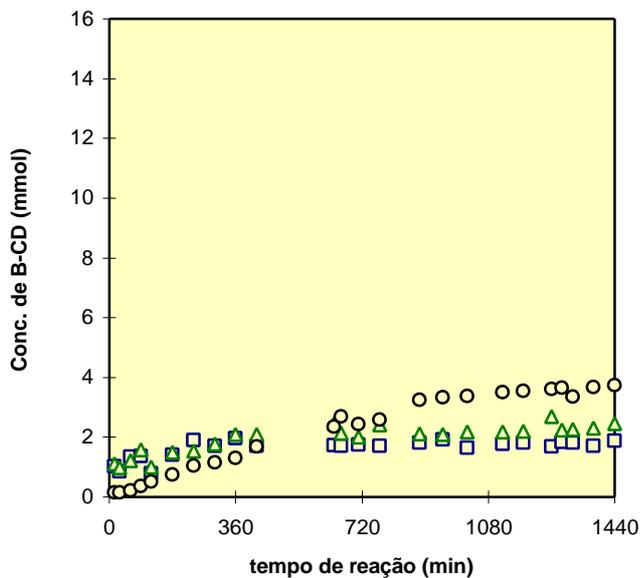


FIGURA 4.19 Concentração de  $\beta$ -CD (mmol) com 0,50 mL de CGTase, solução de amido com D.E. = 22,20; 38°C e pH 6,0. (■) 5% v/v de etanol; (○) F.C.S. e (△) ausência de etanol.

## 4.9.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 4.9.2.1 Volume de CGTase 0,12 mL

A observação da Tabela 4.14 e Figura 4.12 demonstra que quando se utilizam 0,12 mL de enzima CGTase na solução de amido com D.E. = 22,3, o processo de Fermentação e Ciclização Simultânea (F.C.S.) conduz a uma produção de aproximadamente 1,4 mmol de  $\beta$ -CD em 15 horas de reação, enquanto com CGTase obteve-se aproximadamente 0,6 mmol de  $\beta$ -CD e quando se adicionou 3% v/v de etanol, produziu-se da ordem de 0,85 mmol de  $\beta$ -CD.

Pode-se notar na Tabela 4.15 que o meio de F.C.S. produziu aproximadamente 2,4 vezes mais  $\beta$ -CD que no processo onde utilizou-se apenas CGTase, e ainda 60% a mais do que no caso onde adicionou-se 3% v/v de etanol. Isto se deve, provavelmente, ao efeito da maior concentração de etanol produzida pela F.C.S., da ordem de 5% conforme se observa na Tabela 4.22..

Comparando os resultados apresentados nas Tabelas 4.14 e 4.15, para 15 horas de reação e D.E. de 22,3 e 24,3 respectivamente, observa-se que foram obtidas as seguintes concentrações de  $\beta$ -CD: 0,64; 0,98 e 1,4 mmol respectivamente para processo com CGTase; CGTase + etanol e F.C.S.

A observação da Tabela 4.15 e Figura 4.13 demonstra que a  $\beta$ -CD produzida no processo de F.C.S. (aproximadamente 1,60 mmol) é da ordem de 2,4 vezes maior do que a obtida quando se utilizou somente a CGTase (0,65 mmol) e 29% maior do que a obtida com adição de 5% de etanol (1,25 mmol). Neste caso obteve-se no processo de F.C.S. aproximadamente 8% v/v de etanol em 24 horas.

A análise das Figuras 4.12 e 4.13 demonstra que, embora as soluções de amido iniciais apresentem valores diferentes de D.E., porém relativamente próximos, a cinética do processo é bastante semelhante, onde a concentração final de  $\beta$ -CD na ausência de etanol é atingida num menor tempo de reação. No processo F.C.S. a produção de  $\beta$ -CD é gradual, sugerindo que à medida que ocorre a produção de etanol favorece-se a ação da CGTase, o que pode ser atribuído à redução dos efeitos inibitórios da glicose e maltose, ou à complexação do etanol com a ciclodextrina produzida, evitando sua degradação, bem como, reduzindo a ação hidrolítica da CGTase sobre as moléculas de amido. MATTSSON et al. (1991) sugerem que a presença de solventes hidrofílicos no meio reacional podem reduzir a atividade de água na mistura reagente atuando de modo a reduzir a ação hidrolítica da CGTase. LEE & KIM (1991) atribuem a maior produção de  $\beta$ -CD na presença de etanol, à melhora das condições de hidrólise do amido pela CGTase. Contudo o mecanismo exato ainda não está elucidado.

#### 4.9.2.2 Volume de CGTase 0,50 mL

A observação da Tabela 4.16 e Figura 4.14 demonstra, que com uma solução de amido com D.E. = 2,69, o meio onde se adicionou 1% v/v de etanol conduz a uma maior produção de  $\beta$ -CD, que ao final das 24 horas de reação atinge cerca de 11 mmol, enquanto com o processo de Fermentação e Ciclização Simultâneas (F.C.S.) obtém-se aproximadamente 9,3 mmol, o que é 7% superior à concentração obtida no processo onde tinha-se apenas a CGTase (8,7 mmol).

Nos ensaios onde se utilizou uma solução de amido com D.E. = 3,30, obteve-se, em 24 horas de reação aproximadamente, 14,7 ; 11,5 e 11,5, respectivamente para os meios onde se adicionou 3% v/v de etanol, F.C.S. e somente na presença de CGTase ( Figura 4.15 e Tabela 4.17). Neste caso, a produção de  $\beta$ -CD pelo processo F.C.S. e somente com CGTase é praticamente a mesma, e da ordem de 28% inferior àquela onde se adicionou etanol.

Nota-se na Tabela 4.18 e Figura 4.16, que na solução de amido com D.E. = 6,93, no processo F.C.S., em 24 horas de reação produziu-se aproximadamente 9,5 mmol de  $\beta$ -CD, enquanto somente com CGTase obteve-se da ordem de 6,5 mmol e na presença de 3% v/v de etanol adicionado ao meio atingiu-se cerca de 8,7 mmol. Neste caso, o processo F.C.S. mostrou-se 46% superior à CGTase somente, e cerca de 3% superior ao meio onde se adicionou etanol.

A Tabela 4.19 e Figura 4.17 demonstram que ao se utilizar uma solução de amido com D.E. = 9,87, após 24 horas de reação, obtém-se cerca de 10,8 mmol de  $\beta$ -CD no meio onde se adicionou 5% v/v de etanol, contra aproximadamente 8,6 mmol por F.C.S. e 6,8 mmol na presença de apenas CGTase.

Uma análise dos resultados apresentados na Tabela 4.20 e Figura 4.18 mostra que ao se utilizar uma solução de amido com D.E. = 17,18 a maior produção de  $\beta$ -CD em 24 horas de reação, da ordem de 23% e 45% superior, respectivamente, ao meio onde se adicionou 5% v/v de etanol e somente com CGTase (5,4 contra 4,4 e 2,2 mmol) é obtida no processo de F.C.S.

Os resultados apresentados na Tabela 4.21 e Figura 4.19 mostram que ao se utilizar uma solução de amido com D.E. = 22,2 por 24 horas no processo F.C.S. obtém-se aproximadamente 54% e 95% mais  $\beta$ -CD que no meio contendo, 5% de etanol e CGTase, respectivamente.

Na Tabela 4.23, que é um resumo dos resultados obtidos ao final de 24 horas de reação, com os vários volumes de enzima e D.E. estudados, pode-se observar que, de um modo geral, para um mesmo volume de enzima CGTase a produção de  $\beta$ -CD diminui à medida em que se aumenta o grau de hidrólise (D.E.) da solução de fécula à 10% p/v liquefeita com enzima  $\alpha$ -amilase, isto ocorre para as três situações estudadas neste trabalho.

TABELA 4.23 Concentração de  $\beta$ -CD (mmol) em função da D.E. da solução de amido liquefeito e do volume de CGTase na ausência e presença de etanol e por F.C.S.

	D.E.									
	12,02	21,80	22,30	24,32	2,69	3,30	6,93	9,87	17,18	22,20
Volume de CGTase (mL)	0,15	0,15	0,12	0,12	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Etanol adicionado (% v/v)	5	5	3	5	1	3	3	5	5	5
Etanol produzido (F.C.S. -% v/v)	-	-	1,54	2,18	0,84	1,03	1,18	0,86	1,52	1,68
Concentração de $\beta$ -CD (mmol) em 24 horas, sem etanol	1,83*	0,82*	0,59*	0,66	8,72	11,5	6,50	6,80	2,38	1,89
Concentração de $\beta$ -CD (mmol) em 24 horas, com etanol	2,48*	1,30*	0,85*	1,25	11,1	14,7	8,74	10,8	4,41	2,45
Concentração de $\beta$ -CD (mmol) em 24 horas - F.C.S.	-	-	1,41	1,61	9,27	11,5	9,51	8,6	5,44	3,73

(\*) 15 horas de reação.

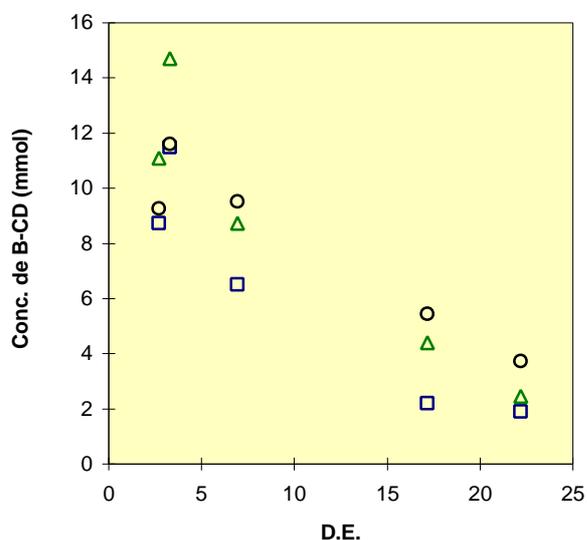


FIGURA 4.20 Concentração de  $\beta$ -CD, em função da D.E. da solução de amido liquefeito, na ausência e presença de etanol e por F.C.S. Volume de enzima CGTase = 0,50 mL. (○) CGTase, (□) CGTase + etanol, e (△) F.C.S.

Nota-se ainda na Tabela 4.23 e Figura 4.20 que ao se utilizar 0,50 mL de CGTase há uma tendência geral de redução da produção de  $\beta$ -CD à medida que se aumenta a D.E. da solução de amido. Resultados semelhantes, porém com amido oriundos de outras fontes (solúvel, batata, milho, etc.) foram reportados por ARMBRUSTER & KOOI (1969); HOKSE et al. (1984); KANEKO et al. (1990); STARNES et al. (1990) e NORMANDO & JORGENSEN (1992), conforme apresentado no item 2.5.8.

A adição de etanol ao meio reacional atua no sentido de aumentar a produção de  $\beta$ -CD em relação à quantidade obtida somente com CGTase, porém também neste caso há uma significativa redução da concentração de  $\beta$ -CD à medida que aumenta a D.E. da solução, passando de 14,7 mmol para uma D.E. = 3,30 a 2,45 mmol para uma D.E. = 22,20 (Tabela 4.23 e Figura 4.20). O efeito benéfico da adição de solventes ao meio reacional é explorado na literatura, como indicado no item 2.5.8. (LEE & KIM, 1991; MATTSSON et al., 1991; e MORI et al., 1995).

No processo de Fermentação e Ciclização Simultâneas (F.C.S.), também observa-se que a produção de  $\beta$ -CD diminui com o aumento da D.E. da solução de amido (Tabela 4.23 e Figura 4.20). Porém neste caso, pode-se notar que para uma relação de aumento da D.E. de 6,73 vezes (3,30 para 22,20) há uma redução da produção de  $\beta$ -CD da ordem de 3,1 vezes (11,5 para 3,73 mmol), enquanto nos meios contendo apenas CGTase e naqueles onde adicionou-se etanol esta redução é praticamente duas vezes maior, isto é, 6 vezes: 11,5 para 1,89 mmol e 14,7 para 2,45 mmol respectivamente. Estes resultados indicam que a remoção de maltose e glicose pela levedura age no sentido de diminuir os efeitos de inibição da CGTase por estes açúcares, bem como parece indicar uma redução das reações de acoplamento com conseqüente incremento na produção de  $\beta$ -CD; porém este fato necessita de mais estudos para ser comprovado experimentalmente, conforme apresentado no item 2.5.4.

Observa-se ainda que no processo de F.C.S., além da remoção contínua da glicose e maltose inicialmente presente no meio, bem como aquela que eventualmente pode ser produzida pelas reações de desproporcionamento, há a formação gradativa de etanol no decorrer da reação. Portanto, neste processo reúne-se as vantagens da eliminação dos açúcares inibidores da CGTase com a presença do etanol, que ao se complexar com a  $\beta$ -CD a protege das reações de acoplamento ou transglicosilação intermolecular. Ainda, o etanol não favorece a ação hidrolítica da CGTase sobre o amido conduzindo à formação de maltose, maltotriose, maltotetraose e maltopentaose que também são fortes inibidores da CGTase (MORI et al., 1995; BENDER, 1985).

A análise da Figura 4.20 e Tabela 4.23 mostra uma tendência de existência de um ótimo de produção de  $\beta$ -CD, situando-se entre uma D.E. igual a 2 e 10, fato esse que necessita ser estudado com mais detalhes.

A continuidade desse trabalho deve seguir com a caracterização da solução de amido liquefeito, logo após a ação da  $\alpha$ -amilase, e ao longo de toda a reação com a enzima CGTase, a fim de se ter subsídios para o estudo da cinética da reação. Sugere-se o emprego da análise dos oligossacarídeos por HPLC.

Também deve-se explorar a alternativa de fermentação após a hidrólise pela  $\alpha$ -amilase, com remoção da levedura antes da adição da CGTase, a fim de verificar se a remoção de glicose e maltose associada à produção de etanol conduz a uma maior produção de  $\beta$ -CD.

A conclusão final deste trabalho, que não teve como proposta inicial explorar todos os aspectos envolvidos na reação, mas sim verificar a possibilidade de produção de  $\beta$ -CD por um processo de Fermentação e Ciclização Simultâneas (F.C.S.), utilizando matéria-prima nacional (amido de mandioca), é de que a tecnologia desenvolvida tem grande potencial de aplicação, necessitando ainda que um grande esforço seja despendido na busca da otimização do processo. Ressalta-se que a literatura envolvendo a utilização de fécula é bastante escassa.

Como contribuições específicas deste trabalho, que na forma como foi concebido é ainda inédito na literatura, pode-se destacar a implantação da metodologia de análise e experimental; a obtenção dos perfis das principais variáveis do processo associadas às condições operacionais úteis à otimização da tecnologia F.C.S.

## 5 CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas com a realização deste trabalho são apresentadas a seguir, na sequência em que apareceram no capítulo de discussão dos resultados.

1. Na hidrólise do amido pela enzima  $\alpha$ -amilase, aumentando-se o tempo de reação, aumenta-se a dextrose equivalente da solução (D.E.);
2. Nas condições utilizadas neste trabalho, pH 6,0 e 38°C, a atividade da enzima ciclodextrina glicosil transferase (CGTase) é aproximadamente igual a 0,083 mmol  $\beta$ -CD/ min ml Enz. estoque quando determinada com uma solução de amido solúvel a 1% p/v;
3. O pH ótimo da enzima CGTase a 38°C encontra-se entre 6 e 7, onde a atividade específica da enzima esteve entre 70,5 e 69,0  $\mu$ mol/ min mg prot., determinada a partir de uma solução de amido solúvel 1% p/v;
4. Maior produção de  $\beta$ -CD, para uma mesma D.E. da solução, é conseguida quando se utiliza uma maior concentração de enzima CGTase, tendo-se alcançado, em 21 horas de reação e 1 mL de CGTase, 2,26 mmol de  $\beta$ -CD, partindo-se de uma solução de amido liquefeito com concentração nominal a 10% p/v, pH 6,0; 38°C e D.E. = 23,5;
5. A produção máxima de  $\beta$ -CD, para uma mesma D.E., é obtida em menor tempo de reação quanto maior o volume de CGTase utilizado;
6. A adição de superfosfato triplo e sulfato de amônio comerciais, não interferiram na produção de  $\beta$ -CD pela CGTase;
7. A produção de  $\beta$ -CD, num meio contendo o mesmo percentual de etanol, aumenta à medida que a D.E. da solução de amido diminui, sendo igual a 3,02 mmol para D.E. = 12,02 e 1,60 mmol para D.E. = 21,81, com a adição de 5% v/v de etanol;
8. A produção de  $\beta$ -CD nos meios contendo etanol, seja adicionado ou produzido por Fermentação e Ciclização Simultâneas (F.C.S.), foi sempre superior àquela obtida apenas com CGTase, independente do volume de enzima utilizado e da D.E. da solução de amido liquefeito, quando a reação foi conduzida a 38°C e pH 6,0;
9. Nos ensaios onde se utilizou soluções de amido com D.E. = 2,69 e 3,30, a maior produção de  $\beta$ -CD foi conseguida no meio reacional onde se adicionou etanol, 1 e 3% v/v respectivamente, tendo-se alcançado, após 24 horas de reação, em torno de 11,0 e 14,7 mmol, o que é da ordem de 7 e 28% superior à produzida pelo processo F.C.S.;

10. A produção de  $\beta$ -CD pelo processo F.C.S. nas soluções com D.E. iguais a 6,93; 17,18 e 22,2 foi, respectivamente 9, 23 e 54% superior ao meio onde se adicionou 3 e 5% v/v de etanol respectivamente e, 46, 45 e 95% maior do que a  $\beta$ -CD produzida no ensaio onde tinha-se apenas CGTase;
11. Para um aumento de D.E. de 6,73 vezes (de D.E. = 3,30 a 22,2) a produção de  $\beta$ -CD nos meios contendo CGTase e etanol adicionado é reduzida em aproximadamente 6,0 vezes, passando de 11,45 para 1,89 mmol e 14,7 para 2,45 mmol respectivamente, enquanto no processo F.C.S. essa redução é de apenas 3,1 vezes, isto é, de 11,5 para 3,73 mmol de  $\beta$ -CD;
12. Os resultados obtidos nesse trabalho mostram uma tendência de existência de maior produção de  $\beta$ -CD, que situa-se nas soluções com D.E. entre 2 e 10, da ordem de 7 a 11 mmol quando se utiliza somente CGTase e de 8 a 11,5 mmol no processo F.C.S, fato esse que necessita ser explorado;
13. O processo F.C.S. para produção de  $\beta$ -CD reúne as vantagens da remoção dos açúcares inibidores da ação da CGTase (glicose e maltose) com aquelas oriundas da presença de etanol no meio reacional;
14. Com a realização deste trabalho demonstrou-se que a tecnologia F.C.S. apresenta um grande potencial de aplicação na produção de  $\beta$ -CD, necessitando ainda que os parâmetros sejam otimizados.

## 6 RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES

Com a realização deste trabalho experimental, buscou-se pesquisar os principais aspectos pertinentes à associação da Fermentação e Ciclização Simultânea (F.C.S.) com a produção de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) pela enzima ciclodextrina glicosil transferase (CGTase), porém, por se tratar de um trabalho inédito, resta ainda um vasto campo a ser explorado.

Com a finalidade de procurar elucidar diversos aspectos, sejam de ordem analítica ou operacional, sugere-se como trabalhos futuros:

- Estudar a variação das condições de pH (4,5 - 6,0) e temperatura (30 - 40°C) em relação à atividade específica da CGTase, onde ter-se-á uma relação melhor e mais ampla para os trabalhos de Fermentação e Ciclização Simultânea (F.C.S.);
- Na produção de  $\beta$ -CD por CGTase, especificamente no meio contendo etanol, analisar esta produção numa faixa maior de concentrações de etanol (1 - 15 %);
- Submeter as soluções de amido liquefeito à análise em HPLC para verificar o teor de oligossacarídeos presentes na solução;
- Estudar a cinética da hidrólise do amido liquefeito, isto é, D.E. obtida em função do tempo de hidrólise;
- Os vários ensaios mostraram resultados de maior produção final de  $\beta$ -CD na faixa de D.E. em torno de 2 a 10, seria interessante o conhecimento mais detalhado da produção nesta faixa de concentração, principalmente no processo F.C.S.;
- Realizar ensaios no sentido de se trabalhar com soluções de amido liquefeito na faixa de 10 a 30% p/v, o que seria de maior interesse industrial, por reduzir o consumo de energia na etapa de concentração e separação da  $\beta$ -CD produzida.
- Estudar a possibilidade de se utilizar um processo de fermentação dos oligossacarídeos antes da reação de formação de  $\beta$ -CD com CGTase, removendo-se a levedura por centrifugação ou ultrafiltração;
- Verificar a possibilidade de se empregar um processo de fermentação com levedura e CGTase co-imobilizadas, em reator de leito fluidizado, buscando dessa forma a produção de  $\beta$ -CD por processo contínuo.
- Acompanhar o pH durante o processo F.C.S.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMBRUSTER, F.C. and KOOI, E.R. Production of cyclodextrin Patent USA 3, 425, 910, 4/Feb/1969, 5p.
- ARMBRUSTER, F.C. Use of cyclohexane in the production of pure alpha - and beta-cyclodextrins. In: HUBER, O. and SZEJTLI, J. eds. Proceedings of the fourth international symposium on cyclodextrins. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1988, p. 33 - 39.
- BAILEY, J.E. and OLLIS, D.F. Biochemical engineering fundamentals. 2nd ed., Mc Graw- Hill, New York, 1986.
- BAR, R. Applications of cyclodextrins in biotechnology. The 8th International Cyclodextrin Symposium, Budapest, March 30 - April 2, Programme and Abstracts, 1996, 5 - i 1.
- BEKERS, O.; UIJTENDAAL, E.V.; BEIJNEN, J.H.; BULT, A. and UNDENBERG, W.J.M. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, **17**, 1503 - 1549, 1991.
- BENDER, H. and KOMIYAMA, M. Cyclodextrin chemistry. Springer-Verlag, New York, 1978, p. 2 - 23
- BENDER, H. Studies on the inhibition by malto - oligosacharides of the cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M 5 al with glycogen. **Carbohydrate Research**, **153**, 291 - 302, 1985.
- BENDER, H. Production, characterization and application of cyclodextrins. In: LISS, A.R. **Advances in Biotechnological Process**, **6**, 31 - 71, 1986.
- BENDER, H. An improved method for the preparation of cyclo - octamilose, using starches and cyclodextrin - glucanotransferase of *Klebsiella pneumoniae* M5 al. **Carbohydrat. Res.**, **124**, 225 - 233, 1983.
- BENES, E. and SZEJTLI, G. Actual trends in the cyclodextrin literature (statistical evaluation) In: The 8th International Cyclodextrin Symposium, Budapest, March 30 - April 2, Programme and Abstracts, 1996, p. 1 - 27.
- BERGSMA, J.; BRUINENBERG, P. M.; HOKSE, H. and MEIBERG, J. B. M. Cyclodextrins from potato starch. recent developments. In: HUBER, O. and SZEJTLI, J., eds., Proceedings of the fourth international symposium on cyclodextrins. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1988, p. 41 - 46.

BRADFORD, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding, **Analytical Biochemistry**, **72**, 248-254, 1976.

CIACCO, C.F. e CRUZ, R. Fabricação de amido e sua utilização. Série Tecnologia Agroindustrial, FTPT/PROMOCET, Campinas, 1980, 152 p.

COTTAZ, S. and DRIGUEZ, H. Substrate - based investigations of the active site of CGTase. In: FRIEDMAN, R.B., ed., Biotechnology of amyloextrin oligosaccharides, ACS Symposium Series, 458, Washington, 1991, p. 44 - 50.

CRAMER, F. Introduction. In: DUCHÊNE, D., ed., Cyclodextrins and their industrial uses, Editions de Santé, Paris. 1987, p: 11 - 18.

DIXON, M. and WEEB, E.C. Enzymes, 3rd ed., Logman Group Limited, London, 1979.

DUCHÊNE, D. and VAUTION, C. Les cyclodextrines: une possibilité d'amélioration des qualités pharmacotechniques des principes actifs. **Les Entretiens du Carla -Tome VII**, Conférence donnée le 24 juin, 1986.

DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their industrial uses. Editions de Santé, Paris, 1987.

ENGLBRECHT, A.; HARRER, G. ; LEBERT, M. and SCHMID, G. Biochemical and genetic characterization of CGTase from an alkalophilic bacterium forming primarily  $\gamma$ - cyclodextrin by affinity chromatography. In: DUCHÊNE, D. ed. Minutes of the 5th international symposium on cyclodextrins, Editions de Santé, Paris, 1990, p. 25 - 31.

FLASCHEL, E.; LANDERT, J. and RENKEN, A. Process development for the production of  $\alpha$ -cyclodextrin. In: SZEJTLI, J. ed., Proceedings of the 1<sup>st</sup> international symposium on cyclodextrins. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, 1982, p. 41 - 49.

FRENCH, D. ; LEVINE, M. L.; PAZUR, J. H. and NOBERG, E. Studies on the Schardinger dextrans. The preparation and solubility characteristics of alpha, beta and gama dextrans. **J. Am.Chem. Soc.**, **71**, 253 - 356, 1949.

FRENCH, D. The Schardinger dextrans. **Adv. Carbohydr. Chem.**, **12**, 189 - 260, 1957.

FRÖMMING, K. H. and SZEJTLI, J. Cyclodextrins in pharmacy. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994.

FUJIWARA, S.; KAKIHARA, H.; WOO, K. B; LEJEUNE, A.; KANEMOTO, M.; SAKAGUCHI, K. and IMANAKA, T. Cyclization characteristics of cyclodextrin glucanotransferase are conferred by the NH<sub>2</sub> - terminal region of the enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, **58**, 4016 - 4025, 1992.

GRIFFITHS, D. and BENDER, M. L. Cycloamyloses as catalyst. **Advances in Catalysis**, **23**, 209 - 259, 1987.

HAMACKER, K. and TAO, B. Y. Screening of gamma - cyclodextrin - producing recombinant *E. coli* using Congo red dye on solid complex media. **Starch/Stärke**, **45**, 181 - 182, 1993.

HAMON, V. and MORAES, F.F. de. Etude préliminaire à l'immobilisation de l'enzyme CGTase WACKER. Laboratoire de Technologie Enzymatique. Université de Technologie de Compiègne. Relatário de Pesquisa, 1990.

HIRAI, H.; TOSHIMA, N. and UENOYAMA, S. Inclusion complex formation of cyclodextrin with large dye molecule. **Polymer J.**, **13**, 607 - 610, 1981.

HOKSE, H.; KAPER, F. S. and WIJPKEMA, J. T. Process for the manufacture of cyclodextrin. Patent USA 4, 477, 568; 16/Oct./1984, 6p.

HORIKOSHI, K. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* n° 221. **Agric. Biol. Chem.**, **35**, 1407 - 1414, 1971.

HORIKOSHI, K. Production and industrial applications of  $\beta$ -cyclodextrin. **Process Biochemistry**, **14**, 26 - 30, 1979

HORIKOSHI, K.; NAKAMURA, N.; MATSUZAWA, N. and YAMAMOTO, M. Industrial production of cyclodextrins. In: SZEJTLI, J., ed., Proceedings of the first international symposium on cyclodextrins, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, 1982, p. 25 - 39.

HORIKOSHI, K. Enzymology and molecular genetics of CD - forming enzymes. In: HUBER, O. and SZEJTLI, J. eds. Proceedings of the fourth international symposium on cyclodextrins. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1988, p. 7 - 17.

JAMUNA, R.; SASWATHI, N.; SHEELA, R. and RAMAKRISHINA, S.V. Synthesis of cyclodextrin glucosyltransferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **43**, 163 - 176, 1993.

KANEKO, T.; YOSHIDA, M.; YAMAMOTO, M.; NAKAMURA, N. and HORIKOSHI, K. Production of cyclodextrins by simultaneous actions of two CGTases from three strains of *Bacillus*. **Starch**, **42**, 277 - 281, 1990.

KATO, T. and HORIKOSHI, D. A new  $\gamma$  - cyclodextrin forming enzyme produced by *Bacillus subtilis* n° 313. **J. Jpn. Soc. Starch Sci.**, **33**, 137 - 143, 1986.

KIM, T.J.; LEE, Y.D. and KIM, H.S. Enzymatic production of cyclodextrins from milled corn starch in an ultrafiltration membrane bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, **41**, 89 - 94, 1993.

KITAHATA, S.; HARA, K.; FUJITA, K.; NAKANO, H.; KUWARA, N. and KOIZUMI, K. Acceptor specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus stearothermophilus* and synthesis of  $\alpha$ -D-glucosyl O- $\beta$ -D-galactosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucoside. **Biosci. Biotech. Biochem.**, **56**, 1386 - 1391, 1992.

KLEIN, C.; HOLLENDER, J.; BENDER, H. and SCHUIZ, G. E. Catalytic center of cyclodextrin glycosyltransferase derived from X-ray structure analysis combined with site-directed mutagenesis. **Biochemistry**, **31**, 8740 - 8746, 1992.

KOMETANI, T.; TERADA, Y.; NISHIMURA, T.; TAKII, H. and SHIGETAKA, O. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species and transglycosylation at alkaline pHs. **Biosci. Biotech. Biochem.**, **58**, 517 - 520, 1994.

LE BAS, G. and RYSANEK, N. Structural aspects of cyclodextrins. In: DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their industrial uses, Editions de Santé, Paris, 1987, p. 107 - 130.

LEE, J. H.; CHOI, K. H.; CHOI, J.Y.; LEE, Y.S.; KNOW, I.B. and YU, J.H. Enzymatic production of  $\alpha$ -cyclodextrin with the cyclomaltodextrin glucotransferase of *Klebsiella oxytoca* 19 -1. **Enzyme Microb. Technol.** **14**, 1017 -1020, 1992.

LEE, Y.D. and KIM, H.S., Enhancement of enzymatic production of cyclodextrins by organic solvents. **Enzyme Microb. Technol.** **13**, 499 - 503, 1991.

LIMA, U.; BORZANI, W.; AQUARONE, E. Biotechnologia - Tecnologia das Fermentações. vol 1, Ed. Edgard Blucher, Ltda, São Paulo, 1975, p. 48 - 69.

MÄKELÄ, M.J. and KORPELA, T.K. Determination of the catalytic activity of cyclomaltodextrin glucanotransferase by maltotriose - methylorange assay. **Bioch. and Bioph. Methods.** **15**, 307 - 318, 1988.

MATTSSON, P.; MÄKELÄ, M. and KORPELA, T. Isolation and purification of gamma-cyclodextrin by affinity chromatography. In: HUBER, O. and SZEJTLI, J, eds, Proceedings of the fourth international symposium on cyclodextrin, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1988, p. 65 - 70.

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

MORI, S.; HIROSE, S.; OYA, T. and KITAHATA, S. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp n<sup>o</sup> 9605. **Biosci. Biotech. Biochem.**, **58**, 1968 - 1972, 1994.

MORI, S.; GOTO, M.; MASE, T.; MATSUURA, A.; OYA, T. and KITAHATA, K. Reaction conditions of the production of  $\gamma$ -cyclodextrin by cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp N<sup>o</sup> 9605. **Biosci. Biotech. Biochem.**, **59**, 1012 - 1015, 1995.

NAKAMURA, A.; HAGA, K. and YAMANE, K. The transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase is operated by a ping-pong mechanism. **FEBS Letters**, **337**, 66 - 70, 1994.

NAKAMURA, N. and HORIKOSHI, K. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase - producing *Alkalophilic Bacillus* sp. **Agr. Biol. Chem.**, **40**, 753 - 757, 1976.

NORMANDO, B. E. and JORGENSEN, S. T. *Thermoanaerobacter* sp. CGTase: its properties and application. **Denpun Kagaku**, **39**, 101 - 108, 1992.

NOVO INDUSTRI, Boletim Técnico B 204 e - E 500, Dec., 1983.

(NSKK), NIHON SHOKUHIN KAKO Co., LTD. CELDEX (Cyclodextrins). technical data. 2nd. ed., 1983, p.13.

PARK, Y.K.; BÄR, W.H. and PAPINI, R.S. Relação entre intumescimento, gelatificação e susceptibilidade dos amidos de mandioca e de milho à alfa-amilase bacteriana. **Revista Brasileira de Tecnologia**, **2**, p. 95 - 100, 1971.

PAZUR, J.H. Enzymatic synthesis and use of cyclic dextrans and linear oligosaccharides of the amylopectin type. In: FRIEDMAN, R.B., ed., Biotechnology of amylopectin oligosaccharides, ACS Symposium Series, 458, Washington, 1991, p. 51 - 71.

PATRICK LEE, K. C. and TAO, B. Y. High - level expression of cyclodextrin glycosyltransferase in *E. coli* using a T 7 promoter expression system. **Starch/Stärke**, **46**, 67 - 74, 1994

PREMA, P.; SREEDHARAN, P.V.; RAJA, K.C.M. and RAMAKRISHNA, S.V. Studies on cyclodextrin glycosyltransferase production and characterization. In: DUCHÊNE, D., ed., Minutes of 5th international symposium on cyclodextrins, Editions de Santé, Paris, 1990, p. 46 - 49.

PSZCZOLA, D.E. Production and potencial food applications of cyclodextrins. **Food Technol.**, **42**, 96 - 100, 1988.

REILLY, P.J. Enzymic degradation of starch. In: VAN BEYNUM, G.M.A. and ROELS, J.A., ed., Starch conversion technology, Marcel Dekker, New York, 1985, p. 101 - 142.

ROBYT, J.F. Strategies for the specific labeling of amyloextrins. In: FRIEDMAN, R.B., ed., Biotechnology of amyloextrin oligosaccharides. ACS Symposium Series, 458, Washington, 1991, p.98 - 110.

SABIONI, J. G. Produção e caracterização da ciclodextrina glicosiltransferase do *Bacillus lentus Alcalofílico*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas - 1991, p. 5 - 27.

SABIONI, J. G. and PARK, Y. K. Production and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus lentus*. **Starch/Stärke**, **44**, 225 - 229, 1992.

SAENGER, W. Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. **Angew Chem. Int.**, **19**, 344 - 362, 1980.

SATO, M. and YAGI, Y. Properties of CGTases from three types of *Bacillus* and production of cyclodextrins by the enzymes. In: FRIEDMAN, R.B., ed., Biotechnology of amyloextrin oligosaccharides, ACS Symposium Series 458, Washington, 1991, p. 125 -137.

SICARD, P. J. and SANIEZ, M.H. Biosynthesis of cycloglycosyltransferase and obtention its enzymatic reaction products. In: DUCHÊNE, D. ed., Cyclodextrins and their industrial uses. Editions de Santé, Paris, 1987, p. 77 - 103.

SOMOGYI, M.; A new reagent for the determination of sugar, **J.Biol. Chem.**, **160**, 61 - 68, 1945.

STANBURY, P.F. and WHITAKER, A. Principles of fermentation technology. Pergamon Press, Oxford, 1984.

STARNES, R.L.; FLINT, V.M. and KATKOCIN, D.M. Cyclodextrin production with a highly thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacter* sp. In: DUCHÊNE, D. ed. Minutes of the 5<sup>th</sup> international symposium on cyclodextrins, Editions de Santé, Paris, 1990, p. 55 - 61.

SWINKELS, J. J. M. Sources of starch, its chemistry and physics. In: VAN BEYNUM, G.M.A. and ROELS, J. A., ed., Starch conversion technology, New York, Marcel Dekker, 1985, p. 15 - 46.

SZEJTLI, J. and SEBESTYÉN, G. Resorption, metabolism and toxicity studies on the peroral application of beta-cyclodextrin **Starch**. **31**, 385 - 389, 1979.

SZEJTLI, J. Cyclodextrins and their inclusion complex. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982, p. 68.

SZEJTLI, J. Industrial applications of cyclodextrins. In: ATWOOD, J. L.; DAVIES, J. E. D. and MACNICOL, D.D. eds. Inclusion compounds, Academic Press, London. **3**, 1984, 331 - 339.

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

SZEJTLI, J. Helical and cyclic structures in starch chemistry. In: FRIEDMAN, R.B. ed., Biotechnology of amyloextrin oligosaccharides, ACS Symposium Series 458, Washington, 1991, p 1 -10.

TABUSHI, I.; KIYOSUKE, Y.; SUGIMOTO, T and YAMAMURA, K. (1978). Approach to the aspects of driving force of inclusion by  $\alpha$ -cyclodextrin. **J. Am. Chem. Soc.**, **100**, 916 - 919, 1978.

TABUSHI, I. Cyclodextrin catalysis as a model for enzyme action. **Chem.Res.**, **15**, 66 - 72, 1982.

TAGUSHI, K. Transient binding mode of phenolphthalein -  $\beta$  - cyclodextrin complex: an example of induced geometrical distortion. **J.Am.Chem.Soc.**, **108**, 2705 - 2709, 1986.

TAWARAH, K. and KHOURI, S.J. An equilibrium study of p - methyl red inclusion complexes with  $\alpha$  and  $\beta$ -cyclodextrins. **Carbohydrate Research**, **245**, 165 - 173, 1993.

TOMITA, K.; MITSUTOSHI, K.; KAWAMURA, K. and NAKAMISHI, K. Purification and properties of a cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus autolyticus* 11149 and selective formation of  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Fermentation Bioengineering**, **75**, 89 - 92, 1993.

VETTER, D. and THORN, W. Chain length specificity of cyclodextrin glycosyltransferase. **Starch**, **44**, 229 - 233, 1992.

VILLETTE, J.; BOWQUELET, S.; LELEU, J.B. and SICARD, P.J. Isolation and mechanism of action of the cyclodextrin-glycosyltransferase from *Bacillus circulans*. In: DUCHÊNE, D., ed., Minutes of the fifth international symposium on cyclodextrins, Edition de Santé, Paris, 1990, p. 32 - 38.

WHISTLER, R.L. and DANIEL, J. R. Molecular structure of Starch. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. and PASCHALL, E.F., ed., Starch: chemistry and technology, Academic Press, Orlando, 1984, p 153 -182.

WHITE, A.; HANDLER, P.; SMITH, E. and STETEN, W. Princípios de Bioquímica. 2 ed. Mc Graw-Hill. Book Company. London, 221 - 235, 1964.

ZANIN, G. M. Sacarificação do amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada., Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989, p. 26 - 65.

## 8 ANEXOS

### 8.1 ANEXO 1 - TEORIA DA COMPLEXAÇÃO

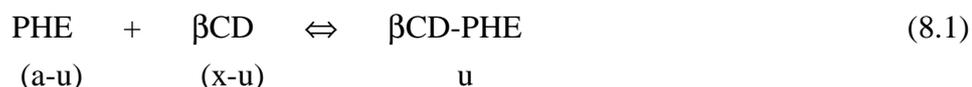
No item 3.2.4, foi descrito o fenômeno da complexação como princípio para a dosagem da  $\beta$ -Ciclodextrina, isto é possível devido a formação de um complexo entre o corante e a molécula de CD a ser dosada. O complexo corante-CD possui uma absorção diferente do corante livre. Esta diferença permite determinar a quantidade de CD do meio.

Existe porém, uma limitação da linearidade entre a absorção e a concentração em CDs. Quanto maior a concentração de ciclodextrinas, mais distante está da linearidade a relação Absorção/Concentração.

A teoria da complexação pode fornecer a relação não linear entre a absorção e a concentração em CDs.

Será utilizada uma abordagem simplificada, específica para a dosagem da  $\beta$ -CD, supondo a existência de um hospedeiro e um hóspede, desenvolvida por HAMON & MORAES (1990).

Partindo-se da reação de formação do complexo entre a fenolftaleína (PHE) e ciclodextrina ( $\beta$ -CD), tem-se:



onde,

- PHE - molécula hóspede = corante = Phenolftaleína
- $\beta$ -CD - molécula hospedeira =  $\beta$ -Ciclodextrina
- a - concentração total de PHE
- x - concentração total de  $\beta$ -CD
- u - concentração do complexo  $\beta$ -CD-PHE

A constante de equilíbrio químico  $k$  para a reação 8.1 é representada pela equação 8.2:

$$k = \frac{u}{(a-u).(x-u)} \quad (8.2)$$

A equação 8.2 pode ser escrita ainda da seguinte forma:

$$x = u \cdot \left[ 1 + \left( \frac{1}{k \cdot (a - u)} \right) \right] \quad (8.3)$$

Como o complexo  $\beta$ CD-PHE é incolor, isto é, a absorvância molecular é zero, pode-se definir a concentração de PHE no meio reacional, como segue:

$$y = (a - u) = a \cdot (A / A_0) \quad (8.4)$$

onde,

$A_0$  - Absorvância na ausência da molécula hospedeira “ $\beta$ CD”

$A$  - Absorvância na presença da molécula hospedeira

Substituindo-se a equação 8.4 na 8.3, tem-se:

$$x = (a - y) \cdot \left[ 1 + \left( \frac{1}{k \cdot y} \right) \right] \quad (8.5)$$

Substituindo “ $y$ ” por “ $a \cdot (A/A_0)$ ” e rearranjando, a equação 8.5, toma a forma:

$$\left[ \frac{x}{1 - \left( \frac{A}{A_0} \right)} \right] = \frac{1}{k} \cdot \left( \frac{A}{A_0} \right) + a \quad (8.6)$$

A equação 8.6 apresenta uma forma linear, onde: “ $1/k$ ” é o coeficiente angular e “ $a$ ” o coeficiente linear.

Juntamente com os valores experimentais, a equação 8.6 pode ser usada para determinar as constantes “ $k$ ” e “ $a$ ”.

A equação 8.5, pode ser rescrita da seguinte forma:

$$[\beta\text{-CD}]_T = \left[ 1 - \left( \frac{A}{A_0} \right) \right] \left[ a + \left( \frac{A_0}{k \cdot A} \right) \right] \quad (8.7)$$

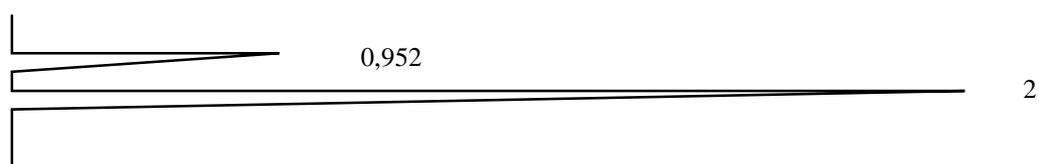
Portanto a equação 8.7 é utilizada para a determinação da concentração de  $\beta$ -CD no meio reacional em qualquer tempo, a partir da absorvância inicial ( $A_0$ ), da absorvância no tempo “t” ( $A$ ) e da constante de equilíbrio da reação “ $k$ ”.

## 8.2 ANEXO 2 - CROMATOGRAMAS E RESULTADOS DAS ANÁLISES DO PORCENTUAL DE ETANOL OBTIDOS NOS ENSAIOS DE F.C.S.

Em todos os ensaios determinou-se o teor de etanol utilizando o método descrito no item 3.2.11. As figuras a seguir ilustram o Cromatograma dos percentuais de etanol e água e as tabelas descrevem os respectivos tempos de retenção.

TABELA 8.1 Resultados do Cromatograma da solução de F.C.S. obtidos com solução de amido com D.E. = 22,30.

SUBSTÂNCIA	TEMPO DE RETENÇÃO (min.)	PORCENTAGEM MOLAR
etanol	0,952	5,641
água	2	94,359
TOTAL	-	100



- mistura água + etanol

FIGURA 8.1 Cromatograma da solução de F.C.S. obtida com solução de amido com D.E. = 22,30.

TABELA 8.2 Resultados do Cromatograma da solução de F.C.S. obtidos com solução de amido com D.E. = 24,32.

SUBSTÂNCIA	TEMPO DE RETENÇÃO (min.)	PORCENTAGEM MOLAR
etanol	1,06	7,9619
água	1,86	92,038
TOTAL	-	100

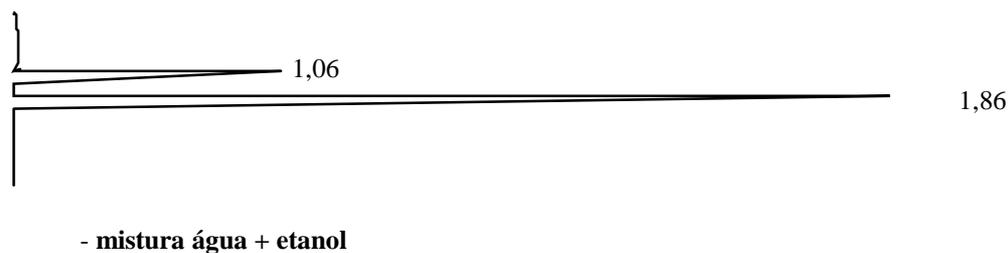


FIGURA 8.2 Cromatograma da solução de F.C.S. obtida com solução de amido com D.E. = 24,32.

TABELA 8.3 Resultados do Cromatograma da solução de F.C.S. obtidos com solução de amido com D.E. = 2,69.

SUBSTÂNCIA	TEMPO DE RETENÇÃO (min.)	PORCENTAGEM MOLAR
etanol	1,05	3,0836
água	1,80	96,9463
TOTAL	-	100



FIGURA 8.3 Cromatograma da solução de F.C.S. obtida com solução de amido com D.E.= 2,69.

TABELA 8.4 Resultados do Cromatograma da solução de F.C.S. obtidos com solução de amido com D.E. = 3,30.

SUBSTÂNCIA	TEMPO DE RETENÇÃO (min.)	PORCENTAGEM MOLAR
etanol	1,11	3,7886
água	1,85	96,2113
TOTAL	-	99,9999



FIGURA 8.4 Cromatograma da solução de F.C.S. obtida com solução de amido com D.E. = 3,30.

TABELA 8.5 Resultados do Cromatograma da solução de F.C.S. obtidos com solução de amido com D.E. = 6,93.

SUBSTÂNCIA	TEMPO DE RETENÇÃO (min.)	PORCENTAGEM MOLAR
etanol	1,10	4,3164
água	1,86	95,6835
<b>TOTAL</b>	-	100

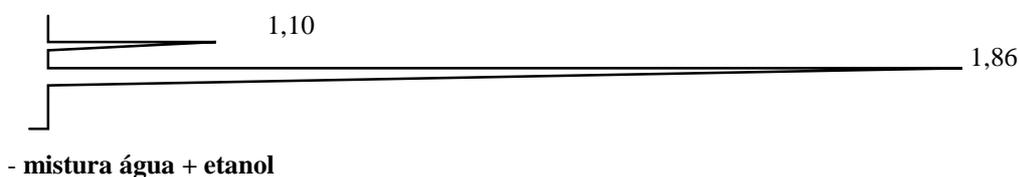


FIGURA 8.5 Cromatograma da solução de F.C.S. obtida com solução de amido com D.E. = 6,93.

TABELA 8.6 Resultados do Cromatograma da solução de F.C.S. obtidos com solução de amido com D.E. = 9,87.

SUBSTÂNCIA	TEMPO DE RETENÇÃO (min.)	PORCENTAGEM MOLAR
etanol	1,11	3,1483
água	1,89	96,8516
<b>TOTAL</b>	-	100

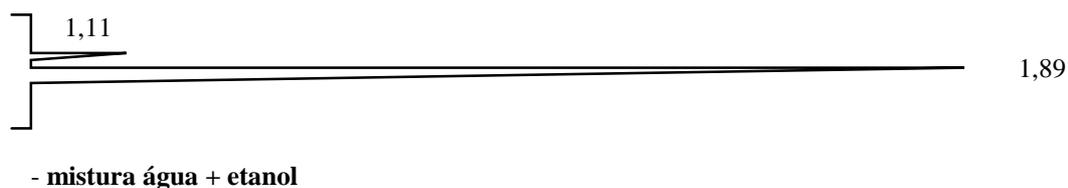


FIGURA 8.6 Cromatograma de uma solução de F.C.S. obtida com solução de amido com D.E. = 9,87.

TABELA 8.7 Resultados do Cromatograma da solução de F.C.S. obtidos com solução de amido com D.E. = 17,18.

SUBSTÂNCIA	TEMPO DE RETENÇÃO (min.)	PORCENTAGEM MOLAR
etanol	1,11	5,584
água	1,86	94,4159
TOTAL	-	100

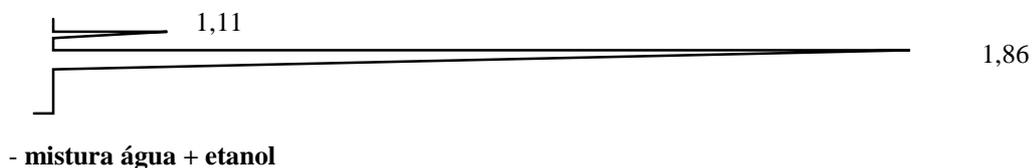


FIGURA 8.7 Cromatograma da solução de F.C.S. obtida com solução de amido com D.E. = 17,18.

TABELA 8.8 Resultados do Cromatograma da solução de F.C.S. obtidos com solução de amido com D.E. = 22,20.

SUBSTÂNCIA	TEMPO DE RETENÇÃO (min.)	PORCENTAGEM MOLAR
etanol	1,09	6,1561
água	1,86	93,8438
TOTAL	-	100

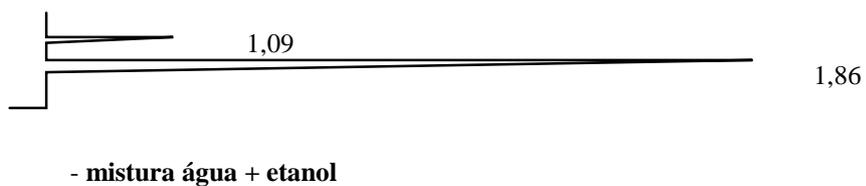


FIGURA 8.8 Cromatograma da solução de F.C.S. obtida com solução de amido com D.E. = 22,20.