

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

MAICON RAMON BUENO

**CULTIVO DESCONTÍNUO ALIMENTADO DE *BACILLUS FIRMUS* NA
PRODUÇÃO DA ENZIMA CICLOMALTODEXTRINA GLUCANO-
TRANSFERASE (CGTASE)**

MAICON RAMON BUENO

**CULTIVO DESCONTÍNUO ALIMENTADO DE *BACILLUS FIRMUS* NA
PRODUÇÃO DA ENZIMA CICLOMALTODEXTRINA GLUCANO-
TRANSFERASE (CGTASE)**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin
Coorientador: Prof.^o Dr.^o José Eduardo Olivo

MARINGÁ – PR
2014

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

B928c Bueno, Maicon Ramon
Cultivo descontinuo alimentado de *Bacillus Firmus*
na produção de enzima Ciclomaltodextrina Glucano-
Transferase (CGTASE) / Maicon Ramon Bueno. - -
Maringá, 2015.
129 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Profa. Dra. Gisella Maria Zanin
Coorientador: Prof. Dr. José Eduardo Olivo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de
Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, 2015.

1. Enzima - Produção (Engenharia Química). 2.
Cyclodextrin. 3 CGTase. 4 *Bacillus Firmus*. 5.
Fermentation. I. Zanin, Gisela Maria, orient. II.
Olivo, José Eduardo, coorient. III. Universidade
Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia.
Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDD 21. ed. 660.634

MGC - 001802

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

Esta é a versão final da Dissertação de Mestrado apresentada por Maicon Ramon Bueno perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 12 de agosto de 2014.

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. José Eduardo Olivo
Coorientador / Presidente



Prof.ª Dr.ª Rita de Cássia Bergamasco
Membro



Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes
Membro

*“O que prevemos raramente ocorre,
o que menos esperamos geralmente acontece.”*
(Benjamin Disraeli)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Osni e Maria, que mesmo em desacordo com minha decisão de abandonar uma carreira na indústria para iniciar o mestrado, estiveram ao meu lado nos períodos difíceis, dando forças para continuar a caminhada, nunca deixando que eu me sentisse só, mesmo estando longe. Obrigado por tudo amados pais.

As minhas queridas irmãs Fabiane e Dayane, que sempre me incentivaram na busca da realização dos meus sonhos, obrigado pelo apoio incondicional.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Gisella Maria Zanin, por todo conhecimento transmitido desde o início deste projeto, obrigado por aceitar meu convite para me orientar mesmo com uma agenda de compromissos bastante apertada.

Ao meu coorientador Prof^o. Dr^o José Eduardo Olivo, obrigado por toda amizade desenvolvida ao longo desse período, que espero seja levada pelo resto de minha vida. Obrigado não só por todo conhecimento técnico que me foi transmitido, mas principalmente pelo apoio emocional nas horas difíceis, jamais teria conseguido concluir este projeto sem o seu apoio. Espero que possamos continuar trabalhando juntos em projetos futuros.

Aos meus amigos Eduardo, Janaína, Joelma e Tássia, ao iniciarmos este mestrado, passaram por muitos momentos difíceis juntos, assim como também passamos muitos momentos bons, a amizade de vocês foi e sempre será muito importante.

Aos meus colegas de trabalho, Fernando Calderaro e Luana Varize, que ajudaram desde o início, transmitindo todo o conhecimento que já haviam adquirido ao trabalhar com o *B. firmus*. Formamos uma verdadeira equipe.

Aos técnicos do laboratório de Tecnologia Enzimática, Lauro e Luiza, sempre dispostos a auxiliar.

À CAPES pelo suporte financeiro.

À minha namorada e amiga, Flávia Sayuri Arakawa, que tive o imenso prazer de conhecer devido à oportunidade de realizar este mestrado. A você minha gratidão por toda paciência, por toda ajuda nesta pesquisa e principalmente por estar presente em minha vida, mesmo longe. Obrigado pelos incentivos diários, principalmente nos momentos que eu pensava que não conseguiria. Descobrimos o amor nas pequenas atitudes cotidianas. Eu consigo finalizar este trabalho em grande parte pelo seu apoio. Meu muito obrigado.

BUENO, Maicon Ramon. **Cultivo Descontínuo Alimentado de *Bacillus firmus* na Produção da Enzima Ciclomaltodextrina Glucano-Transferase (CGTase)**. 2014. 129 f. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química – Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2014.

RESUMO

A enzima Ciclomaltodextrina Glucano-Transferase (CGTase) é industrialmente importante pelo fato de ser única na produção de ciclodextrinas (CDs). As CDs pertencem à família dos oligossacarídeos macrocíclicos que são capazes de formar complexos do tipo receptor-substrato, com habilidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de substâncias que têm suas propriedades alteradas pela complexação, sendo este o principal motivo pelo qual as CDs vêm sendo bastante utilizadas em produtos industriais, tecnológicos e em métodos analíticos, fármacos, alimentos ou em cosméticos. O objetivo desta dissertação foi estudar a cinética envolvida na obtenção da enzima CGTase em processo descontínuo alimentado através da síntese de ciclodextrinas, utilizando amido com substrato e o micro-organismo *Bacillus firmus* Cepa 37, e avaliar as respostas de crescimento celular, atividade enzimática e demais variáveis envolvidas no processo de fermentação. As fermentações foram realizadas em biorreator Bioflo III operado de forma descontínua e descontínua alimentada, para obtenção de parâmetros (pH, temperatura, dosagem de substratos, consumo de substrato, produção de proteínas solúveis, entre outros, em função do tempo de cultivo) com a finalidade de melhorar a atividade da enzima CGTase com rendimento bacteriano. Foram realizados também, experimentos de forma descontínua em incubadora com agitação (*shaker*) para posterior comparação dos resultados. O meio de cultivo para o desenvolvimento bacteriano foi baseado em estudos anteriores de diferentes autores, utilizando o meio padrão de Horikoshi e suas modificações. Neste estudo, foram realizados um total de nove conjuntos de ensaios em diferentes condições, variando o tipo de substrato, a concentração de extrato de levedura e tempo de cultivo. Para a síntese das CDs pela CGTase, utilizando o amido solúvel e o amido comercial, observou-se que este último apresentou valores ligeiramente superiores principalmente em relação a produção de γ -CD. Os melhores resultados obtidos para produção da enzima CGTase na síntese da γ -CD foram verificados nos ensaios onde foram aplicados pulsos de amido e onde foram feitas realimentações do meio de cultivo, dentre eles, o ensaio 7, com aproximadamente 0,26 U/mL para γ -CD e uma menor produção foi obtida para β -CD, de aproximadamente 0,04 U/mL. Para a produção de CGTase na síntese da β -CD, o melhor resultado foi verificado no ensaio onde não houve realimentação e nem aplicação de pulsos de amido (Ensaio 3) em torno de 0,12 U/mL, porém a produção de CGTase para a síntese de γ -CD foi a menos efetiva de todos os ensaios realizados, em torno de 0,02 U/mL. Deste modo, observou-se que a forma descontínua ou descontínua alimentada na operação do biorreator influencia na produção das diversas enzimas CGTase, assim como, a composição do meio de cultivo utilizado também mostrou influência, particularmente na variação da concentração de extrato de levedura. Em estudos anteriores, foi verificado que o *Bacillus firmus* Cepa 37 tem a capacidade de produzir preferencialmente β -CD, porém, neste estudo observou-se um efeito positivo na produção de γ -CD nos ensaios com realimentação do meio de cultivo e também nos ensaios com aplicação de pulsos de amido, este efeito vantajoso pode ser considerado, uma vez que a γ -CD apresenta maior valor comercial devido sua capacidade de inclusão de moléculas maiores.

Palavras-chave: Amido. Ciclodextrina. CGTase. *Bacillus firmus*. Fermentação.

BUENO, Maicon Ramon. ***Bacillus firmus* cultivation in fed batch for Cyclomaltodextrin glucano-transferase enzyme production**. 129 f. Master Thesis in Chemical Engineering – State University of Maringá. Maringá, 2014.

ABSTRACT

The Cyclomaltodextrin Glucanotransferase enzyme (CGTase) is industrially important due to the fact of being the only enzyme in production of cyclodextrins (CDs). The CDs belongs to the family macrocyclic oligosaccharides that are capable to form complexes of receptor-substrate type, with the ability to form inclusion complex with a variety of substances which have their properties changed by complexation, this is the main reason why CDs are been widely used in industrial, technological products and in analytical methods, pharmaceutical drugs, foods or cosmetics. The aim of this dissertation was to study the kinetics involved in obtaining the CGTase enzyme in a fed batch process by the synthesis of cyclodextrins, using starch as substrate and the *Bacillus firmus* Strain 37 micro-organism, and evaluate the cell growth responses, enzymatic activity and other variables involved in the fermentation process. The fermentation tests were performed in Bioflo III reactor operating in batch and fed-batch, for obtaining the parameters such as pH, temperature, dosages substrates, substrate consumption, production of soluble proteins, and among others, in order to improve the activity of the CGTase enzyme with the bacterial yield. Were also performed discontinuous tests in shaking incubator (shaker) for further comparison of results. The culture medium for bacterial growth was based on previous studies of different authors using the standard medium of Horikoshi and its modifications. In this study, we performed a total of nine sets of tests in different conditions by varying the substrate type, the concentration of yeast extract and cultivation time. For the synthesis of CDs by the CGTase enzyme using soluble starch and the commercial starch, it was observed that the commercial starch showed slightly higher values mainly in relation to the production of γ -CD. The better results obtained for the production of CGTase enzyme in γ -CD synthesis were observed in tests where starch pulses were applied and feedback of the medium, among the tests, the test 7, with approximately 0.26 U/mL for γ -CD and a lower yield was obtained for β -CD, about 0.04 U/ml. For production of CGTase in β -CD synthesis, the better result was observed in the test where there was no feedback and no starch pulses applied (Test 3) about 0.12 U / mL, however the production of CGTase for γ -CD synthesis was the less effective of all test performed, about 0.02 U/ ml. Thus, was observed that the batch or fed-batch in the biorretor operation influences the production of several CGTase enzymes, as well as the composition of the medium used also showed influence, particularly on the variation of yeast extract concentration. In previous studies, it was verified that *Bacillus firmus* Strain 37 is capable to produce preferably β -CD, however, in this study observed a positive effect on the production of γ -CD in the tests with feedback of the culture medium and also in tests with application of starch pulses, this advantageous effect may be considered, since the γ -CD exhibit a higher commercial value due to the ability to include larger molecules.

Keywords: Starch. Cyclodextrin. CGTase. *Bacillus firmus*. Fermentation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS REAÇÕES CATALISADAS PELA ENZIMA CICLODEXTRINA GLUCANO-TRANSFERASE.....	25
FIGURA 2 - ESQUEMA DO MECANISMO DE A-RETENÇÃO PRESENTE EM TODA FAMÍLIA A-AMILASE PARA CLIVAGEM DA LIGAÇÃO GLICOSÍDICA	26
FIGURA 3 - CICLIZAÇÃO CATALISADA PELA CGTASE.	27
FIGURA 4 - ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE AMIOSE	29
FIGURA 5 - ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE AMILOPECTINA	30
FIGURA 6 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS ISÔMEROS GLICOSE E FRUTOSE	32
FIGURA 7 - PRINCIPAIS CICLODEXTRINAS	36
FIGURA 8 - ESTRUTURA CÔNICA DAS CICLODEXTRINAS	37
FIGURA 9 - ESTRUTURA CÔNICA DAS CICLODEXTRINAS	37
FIGURA 10 - <i>BACILLUS FIRMUS</i> CEPA 37	44
FIGURA 11 - DEXTRINA DE AMIDO DE MILHO (FONTE: SIGMA-ALDRICH).....	45
FIGURA 12 - FERMENTADOR BIOFLO III	49
FIGURA 13- PLACAS DE PETRI ANTES DA SEMEADURA, DURANTE A INCUBAÇÃO DO <i>BACILLUS FIRMUS</i> CEPA 37 E APÓS RASPAGEM	50
FIGURA 14 - MEIO DE CULTIVO ANTES DA INOCULAÇÃO	52
FIGURA 15 - MEIO DE CULTIVO APÓS INOCULAÇÃO	52
FIGURA 16 - MEIO DE CULTIVO APÓS 48 HORAS DE FERMENTAÇÃO	52
FIGURA 17 - PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE DEXTRINA PARA ANÁLISES DE ATIVIDADE	54
FIGURA 18 - MECANISMO PROPOSTO PARA DESCOLORAÇÃO DA FENOLFTALEÍNA NA PRESENÇA DE B-CD,	56
FIGURA 19 - AMOSTRAS APÓS A REAÇÃO COM FENOLFTALEÍNA	57
FIGURA 20 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO MODELO MOLECULAR DA INCLUSÃO ENTRE Γ -CD E VBC	58
FIGURA 21 - ESQUEMA DAS REAÇÕES ENVOLVIDAS NO MÉTODO DO DNS	61
FIGURA 22 - HIDRÓLISE ÁCIDA DO MEIO APÓS CENTRIFUGAÇÃO E SEPARAÇÃO DO SOBRENADANTE PARA ANÁLISE DE ART	62
FIGURA 23 - AMOSTRA DO MEIO APÓS CENTRIFUGAÇÃO, ONDE PODE SER VERIFICANDO A SEPARAÇÃO DA BIOMAS	64
FIGURA 24 - AR E ART EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM <i>SHAKER</i> ..	67
FIGURA 25 - CONCENTRAÇÃO CELULAR E PH EM FUNÇÃO DO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM <i>SHAKER</i>	68

FIGURA 26 - PROTEÍNAS SOLÚVEIS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM <i>SHAKER</i>	68
FIGURA 27 - PROTEÍNAS SOLÚVEIS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM <i>SHAKER</i>	68
FIGURA 28 - AÇÚCARES REDUTORES E AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III.....	69
FIGURA 29 – pH E CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III	70
FIGURA 30 - PROTEÍNAS SOLÚVEIS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III.....	72
FIGURA 31 - PROTEÍNAS SOLÚVEIS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III	72
FIGURA 32 - AÇÚCARES REDUTORES E CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III.....	73
FIGURA 33 - pH EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III	74
FIGURA 34 - PROTEÍNAS SOLÚVEIS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA REATOR EM BIOFLO III.....	75
FIGURA 35 - PROTEÍNAS SOLÚVEIS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III	75
FIGURA 36 - AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA AS FERMENTAÇÕES REALIZADAS EM REATOR BIOFLO III.....	76
FIGURA 37 - AÇÚCARES REDUTORES EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA AS FERMENTAÇÕES REALIZADAS EM REATOR BIOFLO III.....	77
FIGURA 38 - CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÕES REALIZADAS EM REATOR BIOFLO III.....	77
FIGURA 39 - pH PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM BIOFLO III.....	78
FIGURA 40 - PROTEÍNAS SOLÚVEIS EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÕES REALIZADAS EM REATOR BIOFLO III	79
FIGURA 41 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE B-CD EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÕES REALIZADAS REATOR EM BIOFLO III.....	80
FIGURA 42 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE Γ -Cd EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÕES REALIZADAS EM BIOFLO III	80

FIGURA 43 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA DE B-CD EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III.....	81
FIGURA 44 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA DE Γ -CD EM FUNÇÃO DO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM BIOFLO III.....	81
FIGURA 45 - AR, ART, pH E CC EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III.....	83
FIGURA 46 - PS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA REATOR EM BIOFLO III.....	83
FIGURA 47 - PS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA REATOR EM BIOFLO III.....	84
FIGURA 48 - CONCENTRAÇÕES DE AR, ART, pH E CC EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III.....	85
FIGURA 49 - PS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III.....	86
FIGURA 50 - PS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III.....	86
FIGURA 51 - ART E AR EM FUNÇÃO DO TEMPO, COM PULSOS DE ALIMENTAÇÃO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III.....	87
FIGURA 52 - CONCENTRAÇÃO CELULAR E pH EM FUNÇÃO DO TEMPO, COM PULSOS DE ALIMENTAÇÃO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III.....	88
FIGURA 53 - PS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO, COM PULSOS DE ALIMENTAÇÃO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III.....	89
FIGURA 54 - PS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA EM FUNÇÃO DO TEMPO, COM PULSOS DE ALIMENTAÇÃO PARA FERMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III.....	89
FIGURA 55 - CONCENTRAÇÕES DE ART, AR E CC EM FUNÇÃO DO TEMPO, PARA FERMENTAÇÃO COM REALIMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III.....	91
FIGURA 56 - CONCENTRAÇÃO CELULAR E pH EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO COM REALIMENTAÇÃO REALIZADA REATOR EM BIOFLO III.....	92
FIGURA 57 - CONCENTRAÇÃO CELULAR E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS EM FUNÇÃO DO TEMPO, PARA FERMENTAÇÃO COM REALIMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III.....	92
FIGURA 58 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO COM REALIMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III.....	93

FIGURA 59 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO COM REALIMENTAÇÃO REALIZADA REATOR EM BIOFLO III	93
FIGURA 60 - CONCENTRAÇÃO DE AR, ART E CC EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO COM REALIMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III	94
FIGURA 61 - CONCENTRAÇÃO CELULAR E pH EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO COM REALIMENTAÇÃO REALIZADA REATOR EM BIOFLO III	95
FIGURA 62 - CONCENTRAÇÃO CELULAR E PROTEÍNAS SOLÚVEIS EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO COM REALIMENTAÇÃO REALIZADA REATOR EM BIOFLO III.....	96
FIGURA 63 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO COM REALIMENTAÇÃO REALIZADA REATOR EM BIOFLO III	96
FIGURA 64 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA PARA B E Γ -CD EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA FERMENTAÇÃO COM REALIMENTAÇÃO REALIZADA EM REATOR BIOFLO III.....	97
FIGURA 65 - COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES OBTIDOS PARA AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA CGTASE PARA PRODUÇÃO DE B E Γ -CD PARA O CONJUNTO DE 8 ENSAIOS REALIZADOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVOS.....	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE CGTASE.....	19
TABELA 2 - PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DAS CDS MAIS ESTUDADAS	38
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DO MEIO SEMI-SÓLIDO.....	50
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO PRÉ-INÓCULO.....	51
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DO MEIO LÍQUIDO	51
TABELA 6 - COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	66
TABELA 7 - MEIO CONCENTRADO UTILIZADO NA REALIMENTAÇÃO.....	90

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 OBJETIVOS	17
1.1 OBJETIVO GERAL.....	17
1.1.1 Objetivos Específicos.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 MICRO-ORGANISMO.....	18
2.2 ENZIMAS.....	21
2.2.1 Enzima Ciclomaltodextrina Glucano-Transferase	23
2.3 AMIDO.....	28
2.3.1 Hidrólise do Amido.....	30
2.3.2 Hidrólise Ácida do Amido	33
2.3.3 Hidrólise Enzimática do Amido.....	34
2.4 CICLODEXTRINAS	35
2.5 CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE CGTASE	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 MATERIAIS	44
3.1.1 Micro-organismo.....	44
3.1.2 Substratos	45
3.1.3 Fontes de Íons.....	45
3.1.4 Fontes de Nitrogênio	45
3.1.5 Padrões de Ciclodextrina.....	47
3.1.6 Reagentes de uso geral	47
3.1.7 Equipamentos	47
3.1.8 Biorreator BIOFLO III.....	48
3.2 METODOLOGIA	49
3.2.1 Condições de Cultivo	49
3.2.2 Determinação da Atividade Enzimática da CGTase.....	52
3.2.3 Preparação da curva padrão para dosagem de β -CD.....	55
3.2.4 Preparação da curva padrão para dosagem de γ -CD.....	57
3.2.5 Determinação do teor de proteína (Bradford)	59
3.2.6 Determinação de Açúcares Redutores (DNS).....	60
3.2.7 Determinação de Açúcares Redutores Totais (DNS).....	62

3.2.8	Concentração Celular	63
3.2.9	Curvas de Calibração	64
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1	ENSAIO 1.....	65
4.2	ENSAIO 2.....	67
4.3	ENSAIO 3.....	73
4.4	ENSAIO 4.....	76
4.5	ENSAIO 5.....	82
4.6	ENSAIO 6.....	85
4.7	ENSAIO 7.....	87
4.8	ENSAIO 8.....	90
4.9	ENSAIO 9.....	94
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
	SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	101
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
	ANEXOS	115

INTRODUÇÃO

A degradação enzimática do amido geralmente resulta na produção de glicose, maltose, maltotriose, entre outros compostos, ou seja, malto-oligômeros de cadeias lineares ou ramificadas, conhecidos como dextrinas. Geralmente a degradação do amido é obtida por processo de hidrólise onde o produto resultante provém da quebra da ligação glicosídica acompanhada da adição de uma molécula de água, contudo, se o amido for degradado por uma enzima do tipo Ciclomaltodextrina Glucano-Transferase (CGTase), o produto resultante da quebra da cadeia é submetido a uma reação intramolecular sem a participação da molécula de água.

A CGTase catalisa as reações de transglicosilação intramolecular (ciclização) e intermolecular (ligação, desproporcionamento), bem como apresenta atividade hidrolítica sobre amido e ciclodextrinas (JOGDAND, 2008). A reação de transglicosilação da CGTase é operada pelo mecanismo “Ping Pong”, fato verificado por Nakamura, Haga e Yamanake (1994). Os produtos cíclicos de ligação alfa-1,4 formados quando a enzima CGTase é utilizada, dá-se o nome de ciclodextrinas (CDs) (FRÖMMING; SZEJTLI, 1994; DEL VALLE, 2004; COSTA *et al.*, 2007)

Astray *et al.*, (2009), descrevem as ciclodextrinas como substâncias cristalinas, homogêneas e não higroscópicas, que podem ser consideradas como cápsulas vazias, de um determinado tamanho molecular, com a capacidade de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de compostos. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos não redutores compostos principalmente por 6, 7 e 8 unidades de glicose, as quais são denominadas de alfa, beta e gama-CDs, respectivamente, (MATIOLI *et al.*, 2008, ROSA & SAVARIZ 2005, JUNIOR *et al.*, 2007).

Devido à reação de ciclização, a extremidade redutora e não redutora se ligam, de forma que todas as CDs são não redutoras, esta propriedade faz com que as CDs sejam amplamente utilizadas em alimentos, fármacos e outros produtos químicos. Elas apresentam uma cavidade interna hidrofóbica e a região externa hidrofílica. Tal característica favorece sua interação com uma variedade de substâncias, formando complexos de inclusões que alteram as características físicas e químicas da molécula hóspede. (TONKONVA, 1998; ROSA & SAVARIZ 2005; CAO *et al.*, 2005).

A propriedade das CDs de encapsular espécies iônicas ou moleculares e orientá-las em sua cavidade, faz com que as CDs se tornem objetos de grande atenção, fato que explica o interesse de vários autores no estudo da síntese da CGTase, visando melhores

condições no estudo dos parâmetros necessários para o aumento de sua produção em larga escala e assim potencializar seu uso na indústria, uma vez que o custo relativamente alto das CDs, está diretamente ligado aos custos e dificuldades na produção, separação e purificação das CGTases.

Segundo Bertolini *et al.*, (1998), alguns dos efeitos da encapsulação de compostos por CDs são a proteção contra oxidação, degradação pela luz, calor, perdas por volatilidade, a redução ou eliminação de sabores ou odores desagradáveis, estabilização de drogas, cores, vitaminas, aromatizantes e saborizantes, a produção de emulsões, o aumento de solubilidade de produtos fármacos e alteração de características químicas.

Enzimas são catalisadores biológicos, em sua maioria de origem proteica, formados por aminoácidos, responsáveis por um grande número de reações metabólicas que ocorrem nos seres vivos, neste contexto, micro-organismos apresentam considerável interesse, pois suas biomoléculas constituem modelos naturalmente interessantes para aplicações em bioprocessos.

O *Bacillus firmus* CEPA 37 é um micro-organismo alcalofílico, isolado de solo brasileiro, que apresenta alta atividade enzimática em testes de precipitação (MATIOLI *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2013). Gawande *et al.*, (1999) obteve atividade máxima de CGTase igual a 7,05 U/mL, usando *Bacillus firmus* em meio com amido de milho, extrato de levedura e pH inicial de 9,8. Marques (2004) em seus estudos utilizando *Bacillus firmus* CEPA 37, atingiu máxima atividade enzimática de 0,84 U/mL em 60 h de cultivo, utilizando um meio contendo 2,5 % de amido de milho e 1,0 % de peptona, cujo objetivo era testar diferentes meios de cultura na produção de CGTase. Carmello (2007) obteve atividade máxima de 1,2 U/mL utilizando um meio contendo 1,0 % de amido solúvel hidrolisado e 0,5 % de polipeptona, em diferentes condições de agitação e aeração. Santos *et al.*, (2013) utilizando um meio contendo 2,0 % de amido de milho e extrato de levedura atingiu uma atividade de 0,22 U/mL estudando a influência do pH do meio. Estes estudos foram realizados em processo descontínuo.

Uma grande variedade de amidos pode ser utilizado como substrato para síntese da CGTase. O Estado do Paraná é o segundo maior produtor de amido do país (Da SILVA, 2010), este é um fator motivacional para o desenvolvimento de técnicas para melhoria na produção da CGTase e conseqüentemente minimização dos custos relativamente altos na produção das CDs, viabilizando seu uso comercial.

Dentro deste contexto, buscou-se com este estudo explorar métodos e diferentes formas de cultivo do micro-organismo *Bacillus firmus* CEPA 37 em biorreator

(forma descontínua e descontínua alimentada) e *shaker*, visando o aumento da produção da CGTase para síntese de CDs.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Obtenção da enzima CGTase em processo descontínuo alimentado para produção de ciclodextrinas, utilizando o micro-organismo *Bacillus firmus* CEPA 37 e avaliação das respostas de crescimento celular, atividade enzimática e demais variáveis envolvidas no processo de fermentação.

1.1.1 Objetivos Específicos

Analisar o comportamento do micro-organismo *Bacillus firmus* CEPA 37, em resposta às dosagens de substrato durante o processo descontínuo alimentado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micro-organismo

Segundo French (1957), o primeiro relato da existência das Ciclodextrinas (CDs), foi descrito por Villiers em 1881, segundo o qual, obteve uma pequena quantidade de material cristalino após a hidrólise do amido utilizando *Bacillus amylobacter*, produzindo assim as primeiras dextrinas de Schardinger.

Em 1904, Schardinger caracterizou as CDs como oligossacarídeos cíclicos e identificou o *Bacillus macerans* como produtor da ciclomaltodextrina glucano-transferase, uma enzima que modificava a estrutura do amido (MAZONI *et al.*, 2000; CEREDA & VILPOUX, 2004).

Em 1938 Freudenberg, confirmou a estrutura das ciclodextrinas e sua capacidade de formar complexos de inclusão, logo após em 1939 Tilden e Hudson descobriram uma amilase sintetizada pelo *Bacillus macerans* que produzia as CDs, assim comprovando que as CDs não eram produtos sintetizados durante o metabolismo microbiano, mas sim resultantes da ação de uma enzima extracelular, produzida pelo micro-organismo capaz de hidrolisar o amido em compostos relacionados. (AGUIAR, 2001).

Aproximadamente a partir da década de 50 aumentou-se o interesse na produção de CDs e novas espécies foram encontradas, estudadas e catalogadas por vários pesquisadores, a Tabela 1 apresenta alguns destes micro-organismos e algumas características das CGTases produzidas. (AGUIAR 2001; MARQUES 2004; SANTOS *et al.*, 2013).

Matioli (2000), baseada na literatura, cita aproximadamente 15 espécies de bactérias produtoras de CGTase, de diversas linhagens como as aeróbias mesofílicas, termofílicas, alcalofílicas e halofílicas, além das anaeróbias termofílicas. Entre estes micro-organismos está presente o *Bacillus firmus* CEPA 37, objeto de estudos deste trabalho.

Tabela 1 - Micro-organismos produtores de CGTase

Micro-organismo	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	CD	Referência
<i>Archae B1001</i>	5 a 5,5	90 a 100		TACHIBANA <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus A11</i>	4 a 8	40 a 50	β-CD	TECHAIYAKUL <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus A-40-2</i>	5	55		HORIKOSHI, 1971
<i>Bacillus autolyticus</i>	5 a 6	60	β-CD	TOMITA <i>et al.</i> , 1993
<i>Bacillus cereus</i> NCIMB 13123	5	40	α-CD	JAMUNA <i>et al.</i> , 1993
<i>Bacillus circulans</i>	8	55	β-CD	SATO <i>et al.</i> , 1991
<i>Bacillus circulans</i> C31	5	60	β-CD	PONGSAWASDI & YAGISAWA, 1988
<i>Bacillus circulans</i> var-Alcalofílico ATCC 21783	–	45	β-CD	NAKAMURA & HORIKOSHI, 1997
<i>Bacillus coagulans</i>	5	60	β-CD	KANEKO <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus firmus</i> CEPA 37	10	37	β-CD	MATIOLI, 1997; SANTOS, 2013
<i>Bacillus firmus</i> 324	7,5 a 8,5	65	β-CD	YIM, 1996
<i>Bacillus lentus</i>	5 a 7	45 a 55	β-CD	SABIONI <i>et al.</i> , 1992
<i>Bacillus macerans</i>	5	50	α-CD	SATO <i>et al.</i> , 1991
<i>Bacillus macerans</i> ATCC 8514	–	60	–	De PINTO <i>et al.</i> , 1968
<i>Bacillus macerans</i> IFO 3490	–	55	α-CD	KITAHATA <i>et al.</i> , 1974
<i>Bacillus megaterium</i>	5 a 6	60	β-CD	KITAHATA & OKADA, 1974
<i>Bacillus megaterium</i> 5	–	55	β-CD	KITAHATA <i>et al.</i> , 1974
<i>Bacillus ohbensis</i>	5	60	β-CD	SATO <i>et al.</i> , 1991
<i>Bacillus ohbensis</i> sp. Nov. C-1400	5	40	β-CD	SIN <i>et al.</i> , 1991
<i>Bacillus</i> sp	–	45	–	PREMA <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus</i> sp	5	50 a 55	β-CD	KOMETANI <i>et al.</i> , 1994
<i>Bacillus</i> sp HÁ 3-3-2	5 a 8	60	–	NOMOTO <i>et al.</i> , 1984 NOMOTO <i>et al.</i> , 1986
<i>Bacillus</i> sp IT25	5	65 a 70	β-CD	AOKI <i>et al.</i> , 1987
<i>Bacillus</i> sp 9605	7	50	γ-CD	MORI <i>et al.</i> , 1994
<i>Bacillus sphaericus</i> E-244	8	-	-	OGUMA <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus subtilis</i> 313	8	65	γ-CD	KATO & HORIKOSHI, 1986
<i>Bacillus</i> 1-1	6 a 8	50	β-CD	ENGLBRECHT <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus</i> 221	10	60 a 65	-	HORIKOSHI, 1971
<i>Bacillus</i> 290-3	6 a 8	60	γ-CD	ENGLBRECHT <i>et al.</i> , 1990

Tabela 1 - Micro-organismos produtores de CGTase

Micro-organismo	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	CD	Referência
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	6	65	-	SAHA <i>et al.</i> , 1991
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7	45	α -CD	ENGLBRECHT <i>et al.</i> , 1990
<i>Klebsiella oxytoca 19-1</i>	5 a 7	30 a 45	α -CD	LEE <i>et al.</i> , 1992
<i>Thermoanaerobacter B6A</i>	6	60	-	SAHA <i>et al.</i> , 1991
<i>Thermoanaerobacter sp</i>	6	90 a 95	β -CD	NORMAN & JORGENSEN, 1992
<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i>	5 a 7	80 a 85	β -CD	WIND <i>et al.</i> , 1995

Adaptada de MATIOLI (1998); MARQUES (2004); CARMELO (2012); SANTOS (2013).

Em 1998 pesquisando micro-organismos produtores de CGTase, Matioli isolou 57 CEPAs, entre elas o *Bacillus firmus* CEPA 37, que apresentou maior atividade em testes de precipitação de CDs com tricloroetileno. O micro-organismo *Bacillus firmus* CEPA 37 é uma bactéria endo-esporulada e alcalofílica, capaz de produzir a enzima CGTase por mecanismo extracelular. Isolado do solo brasileiro de plantação de mandioca por Matioli *et al.*, (1998). Uma das enzimas produzidas pelo *Bacillus firmus* foi identificada como β -CGTase por Matioli (AGUIAR, 2001; SANTOS *et al.*, 2013), onde após purificação, apresentou peso molecular de 77,6 kD sendo utilizada na conversão de uma solução de maltodextrina 10% para ciclodextrina, apresentando um rendimento de 21,4% como β -CD, mostrando-se estável a 60 °C em pH 8 em presença de íons de cálcio. Em 1997, Matioli verificou que a adição de glicirrizina como agente complexante, fazia com que a CGTase ao degradar o amido de milho, produzisse preferencialmente γ -CD (AGUIAR, 2001). Vários micro-organismos foram descritos como produtores da CGTase, desde a sua descoberta, predominantemente o gênero *Bacillus* é o que mais se destaca (ALVES-PRADO *et al.*, 2002, MAHAT *et al.*, 2004). Dentre as bactérias já identificadas como produtoras da CGTase, destacam-se: aeróbias mesofílicas (como *Bacillus macerans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus obhensis*, *Bacillus agaradhaerens* LS-3C, *Bacillus firmus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Paenibacillus pabuli*), aeróbias termofílicas (*Bacillus stearothermophilus*), algumas anaeróbias termofílicas (*Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1, *Thermoanaerobacter sp.* ATCC 53627) e anaeróbias termoalcalófilas (*Anaerobranca gottschalkii*) (TONKOVA, 1998; ABD RAHMAN *et al.*, 2004; AVCI *et al.*, 2009).

A busca por micro-organismos tolerantes a condições extremas tem sido uma das frentes de pesquisa sobre a CGTase, visando maior facilidade de aplicação industrial.

2.2 Enzimas

Nos últimos anos, vem se observando um aumento significativo em nível mundial da utilização de produtos biotecnológicos, especialmente proteínas e enzimas, para o setor industrial. Assim inúmeros esforços são realizados no sentido de aperfeiçoar seus processos de produção de forma a se obter melhores rendimentos e valores de produtividade mais elevados. Neste contexto, os micro-organismos apresentam considerável interesse biológico devido suas biomoléculas constituírem modelos naturalmente interessantes para aplicação em bioprocessos ou para ser otimizadas na tentativa de melhores qualidades (GOMES *et al.*, 2007).

As enzimas são catalisadores biológicos, formadas por aminoácidos, que participam de um grande número de reações metabólicas que ocorrem nos seres vivos (BAILEY & OLLIS, 1986; SILVA, ALCÂNTARA & MONTEIRO, 2011). Atuam de modo a acelerar a velocidade de uma reação bioquímica, reduzindo a energia de ativação sem, no entanto, alterar a constante de equilíbrio ou a energia livre da reação. Como a enzima não é consumida na reação, sua ação catalítica é semelhante à dos catalisadores inorgânicos (MOTTA, 2009). O que distingue as enzimas de um catalisador químico comum, é a sua capacidade de catalisar uma reação sob condições suaves, como em soluções aquosas à temperatura e pressão normais, com conseqüente diminuição do risco de desnaturação térmica dos compostos termo lábeis (BAILEY & OLLIS, 1986; SILVA, ALCÂNTARA & MONTEIRO, 2011). Talvez as enzimas sejam as moléculas biológicas usadas há mais tempo pelo homem, mesmo que de forma inconsciente, na produção de pães e vinho, na antiguidade.

A ciência que estuda as enzimas é denominada de enzimologia (MONTEIRO & SILVA, 2009). O termo enzima foi introduzido pela primeira vez por volta de 1878 por Willian Kühne (do grego en = dentro zyme = levedura) para designar as substâncias contidas nos extratos de levedura usados em fermentação.

Em 1897, Eduard Buchner descobriu que os extratos de levedo podiam fermentar o açúcar até álcool e provou que as enzimas envolvidas na fermentação continuavam funcionando mesmo quando removidas das células vivas, o que lhe renderia o prêmio Nobel de Química em 1907. Porém, um dos grandes momentos da enzimologia aconteceu em 1926, quando James Summer isolou e cristalizou a urease e demonstrou sua origem proteica. Em 1930, Northrop e Stanley realizaram estudos mais detalhados de

cristalografia de três enzimas digestivas, a pepsina, a tripsina e a quimotripsina, o que os levou ao recebimento de um Prêmio Nobel da Química mais tarde, em 1946. A partir dessa data, com o desenvolvimento de novas técnicas de cristalografia e, sobretudo a tecnologia do DNA recombinante, várias enzimas foram isoladas, purificadas e cristalizadas. Hoje temos o conhecimento da estrutura e função de mais de duas mil enzimas de origem animal, vegetal e microbiana (NELSON & COX, 2002, MONTEIRO & SILVA, 2009; FOELKEL, 2013).

Devido aos grandes avanços no isolamento e identificação de novas enzimas, em 1956 a União Internacional de Bioquímica criou uma Comissão Internacional de Enzimas para estabelecer critérios para a nomenclatura e a classificação das enzimas, a fim de se evitar a nomenclatura aleatória de uma mesma enzima estudada por diferentes pesquisadores. As enzimas foram divididas em seis classes de acordo com o tipo de reação que catalisam (RICARDO & TEIXEIRA, 1976; MONTEIRO & SILVA, 2009):

- i. Oxirredutases: catalisam reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons;
- ii. Transferases: transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil, entre moléculas;
- iii. Hidrolases: catalisam reações de hidrólise de ligação covalente
- v. Liases: adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos deixando dupla ligação;
- v. Isomerases: reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos;
- vi. Ligases: condensação de duas moléculas, sempre às custas de energia, geralmente do ATP;

Cada enzima descrita recebe um número de classificação, conhecido por “E.C.” (Enzyme Commission), que é composto por 4 dígitos:

- i. Classe
- ii. Sub-classe dentro da classe
- iii. Grupos químicos específicos que participam da reação.
- v. A enzima propriamente dita (IUPAC, 1979; RICARDO & TEIXEIRA, 1976; MONTEIRO & SILVA, 2009).

Os reagentes que participam das reações catalisadas pelas enzimas são denominados de substratos. Efetivamente, quando se compara a conversão de um substrato em produto catalisado por enzima e outro por um catalisador químico, observa-se uma rápida conversão com o uso das enzimas. Além disso, as enzimas não alteram o equilíbrio químico

das reações e aceleram uma reação reversível em ambos os sentidos (GAMA, AIRES-BARROS, CABRAL, 2003; MONTEIRO & SILVA, 2009).

Estima-se que 80% das enzimas sejam produzidas por fermentação e muitas destas adicionadas em detergentes ou utilizadas no processamento de amido e de produtos lácteos. O processamento de amido constitui-se numa das muitas aplicações da tecnologia enzimática. O uso de enzimas em processos industriais tem sido amplamente discutido e cerca de 2500 reações diferentes, catalisadas por enzimas estão listadas no *International Union Handbook of Enzyme Nomenclature* (AGUIAR, 2001).

Produzir e obter moléculas nativas produzidas por organismos selvagens compreende um conjunto de operações que incluem o tratamento da matéria prima, o preparo de meio de propagação e produção, seguido das etapas de separação e purificação do produto (BON *et al.*, 2008). A obtenção de microrganismos que produzam enzimas com aplicação industrial pode ser feita de várias maneiras, tais como isolamento a partir de recursos naturais, compra em coleções de culturas, obtenção de mutantes naturais, obtenção de mutantes induzidos por métodos convencionais e obtenção de microrganismos recombinantes por técnicas de engenharia genética (VAZ; PRADO & CARVALHO, 2007). Após a obtenção do microrganismo, este é cultivado em fermentadores para a produção de quantidades industriais do biocatalisador. Nesse caso, é fundamental a otimização do meio de cultivo. Esses fatores a serem otimizados são: pH e temperatura, condições de aeração e agitação adequada (MONTEIRO & SILVA, 2009).

Este trabalho tem como escopo, a produção da ciclomaltodextrina glucano-transferase (CGTase, E.C. 2.4.1.19), que será discutido mais profundamente nos próximo tópico.

2.2.1 Enzima Ciclomaltodextrina Glucano-Transferase

A degradação enzimática do amido geralmente resulta na produção de glicose, maltose, maltotriose, etc., isto é, malto-oligômeros de cadeias lineares ou ramificadas, conhecidos como dextrinas. Esse tipo de degradação do amido é um processo de hidrólise em que o produto resultante provém da quebra da ligação glicosídica acompanhada da adição de uma molécula de água, contudo, se o amido é degradado por uma enzima do tipo ciclomatodextrina glucano-transferase (CGTase), o produto resultante da quebra da cadeia é submetido a uma reação intramolecular sem a participação da molécula de água. Produtos cíclicos de ligação alfa-1,4 são formados se a enzima for uma Ciclomaltodextrina Glucano-

Transferase, e são conhecidos como ciclodextrinas (FRÖMMING; SZEJTLI, 1994; DEL VALLE, 2004; COSTA *et al.*, 2007). A CGTase catalisa as reações de transglicosilação intramolecular (ciclização) e intermolecular (ligação, desproporcionamento), bem como apresenta atividade hidrolítica sobre amido e ciclodextrinas (VAN DER VEEN, *et al.*, 2000a; JOGDAND, 2008). A reação de transglicosilação da CGTase é operada pelo mecanismo “Ping Pong”, fato verificado por NAKAMURA, HAGA e YAMANAKE (1994).

A CGTase é uma enzima extracelular da família das α -amilases do grupo das transferases (UITDEHAAG *et al.*, 1999; AGUIAR 2001). Podendo ser proveniente de diferentes fontes, e apresenta similaridade na sequência de seus aminoácidos, variando de 47% a 99% (QI & ZIMMERMANN, 2005). Atualmente, existem vários micro-organismos identificados como seus produtores, destacando-se o gênero *Bacillus*, que foi identificado como uma das linhagens com maior produção (MAHAT *et al.*, 2004). Gawande *et al.*, (1999) obteve atividade máxima de CGTase igual a 7,05 U/mL, usando *Bacillus firmus* em meio com amido de milho, extrato de levedura e pH inicial de 9,8 (MATIOLI *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2013).

A CGTase é a principal responsável pela síntese das ciclodextrinas, a partir de reações reversíveis de hidrólise do amido (GUNARATNE *et al.*, 2007), podendo dar origem a três tipos de CDs: α , β e γ -CD, sendo que na maioria das vezes ocorre formação de uma mistura das CDs e a proporção de cada uma varia dependendo da bactéria de origem, do tempo e das condições de reação (GOH *et al.*, 2009), em condições normais (diferentes para cada micro-organismo) a formação de β -CD ocorre em maiores quantidades (MORIWAKI, *et al.*, 2007).

A CGTase é capaz de reconhecer e agir sobre o amido solúvel e substratos glicanos α - (1,4) lineares, tais como maltose, maltodextrina e maltotriose. Quatro reações distintas são catalisadas pela CGTase (Figura 1). Segundo Svensson *et al.*, (2009) ocorrem três reações de transglicosilação e uma de hidrólise.

A principal reação é de desproporcionalização, onde um oligossacarídeo linear é clivado e uma das partes é transferida para outro aceptor também linear. A ciclização, reação de transglicosilação intramolecular, ocorre quando a extremidade não redutora de um oligossacarídeo linear é ligada em sua própria extremidade redutora, formando produtos cíclicos (CDs). Quando a cadeia de um oligossacarídeo linear (amido ou maltodextrina) é clivada e um açúcar com final redutor é transferido para o açúcar não redutor da mesma cadeia ocorre a reação de ciclização. Mais especificamente, o aminoácido Asp 129 liga-se ao oligossacarídeo linear formando um intermediário covalente e a cadeia linear passa a assumir

a conformação cíclica (UITDEHAAG, *et al.*, 2002; GUNARATNE, *et al.*, 2007). Já no acoplamento, reação inversa da ciclização, ocorre à abertura de um anel de ciclodextrina seguida pela transferência para outro oligossacarídeo linear (VAN DER VEEN *et al.*, 2000). Finalmente, em menor proporção, a enzima é capaz de catalisar reações de hidrólise de ligações glicosídicas (VAN DER VEEN *et al.*, 2000, VAN ALEBEEK *et al.*, 2000; UITDEHAAG, VAN DER MARREL *et al.*, 2002; QI *et al.*, 2007).

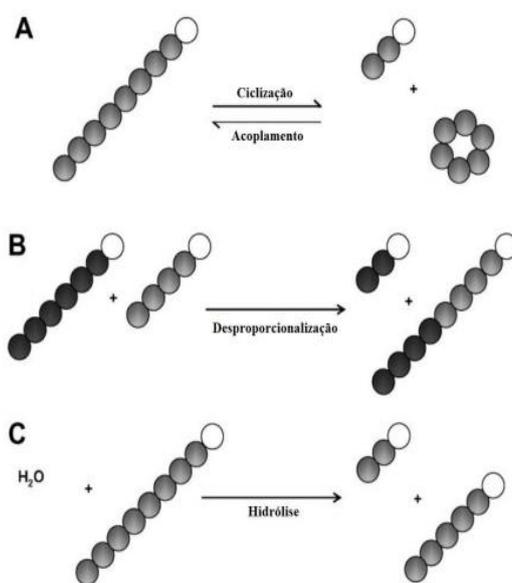


Figura 1 - Representação esquemática das reações catalisadas pela enzima Ciclodextrina Glucano-Transferase. Onde, (A) Ciclização e Acoplamento; (B) Desproporcionalização; (C) Hidrólise. Os resíduos de glicose são representados pelos círculos sombreados, e os círculos brancos indicam seus terminais redutores (SVENSSON *et al.*, 2009).

O mecanismo básico destas quatro reações é encontrado em toda família das α -amilases, chamado de α -retenção (Figura 2), e diferem apenas na molécula receptora. Estudos de cristalografia e de metagênese revelaram que os resíduos catalíticos são constituídos por três aminoácidos de alta conservação entre os membros desta família: Asp229, Glu257 e Asp328 (numeração estabelecida para CGTases) (VAN DER VEEN *et al.*, 2000; VAN ALEBEEK *et al.*, 2000; UITDEHAAG, VAN DER VEEN *et al.*, 2002; QI, MOKHTAR *et al.*, 2007).

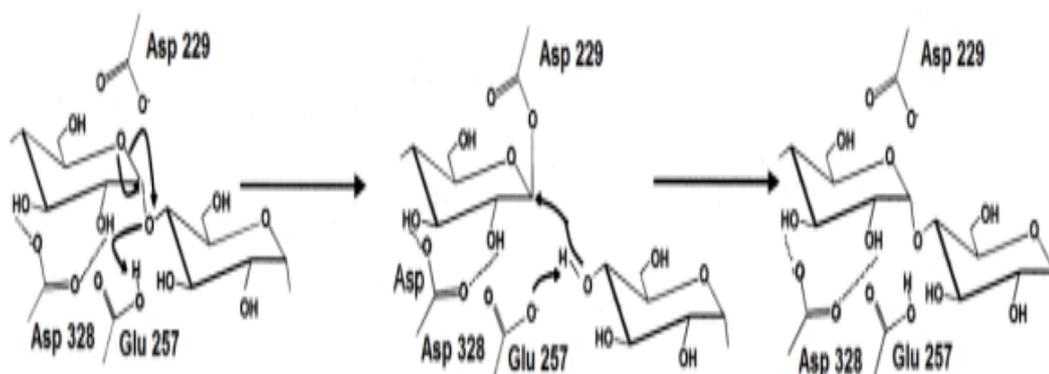


Figura 2 - Esquema do mecanismo de α -retenção presente em toda família α -amilase para clivagem da ligação glicosídica (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002)

Quando a cadeia de um oligossacarídeo linear (amido ou maltodextrina) é clivada e um açúcar com final redutor é transferido para o açúcar não redutor da mesma cadeia ocorre a reação de ciclização. Mais especificamente, o aminoácido Asp 129 liga-se ao oligossacarídeo linear formando um intermediário covalente e a cadeia linear passa a assumir a conformação cíclica (UITDEHAAG, *et al.*, 2002; GUNARATNE, *et al.*, 2007).

A Figura 3, representa o produto da reação de ciclização catalisada pela CGTase, e tem se tornado foco de grande interesse, visto que esta é a única enzima capaz de produzir oligossacarídeos cíclicos (CDs).

Todas as CGTases bacterianas são capazes de converter amilose ou amilopectina em uma mistura de α , β e γ -ciclodextrinas, respectivamente; porém diferem em seus produtos específicos (quantidades de cada CD). Assim de acordo com a sua especificidade de produto, as CGTases são frequentemente classificadas em três subgrupos: α , β ou γ -CGTase (VAN DER VEEN *et al.*, 2000; VAN ALEBEEK *et al.*, 2000; QI e ZIMMERMANN, 2005). Algumas pesquisas revelam que as CGTases podem sintetizar CDs com grau de polimerização maior, chegando a 60 resíduos de glicose na etapa inicial da reação (TERADA *et al.*, 1997; DIJKHUIZEN, 2010) e posteriormente, são convertidas à α , β e/ou γ -CD devido a sua susceptibilidade às reações de hidrólise e acoplamento. Entretanto, o tamanho da CD obtida é altamente dependente do tipo de CGTase, das condições de reação e da escolha do processo de produção (QI e ZIMMERMANN, 2005; GOH *et al.*, 2009).

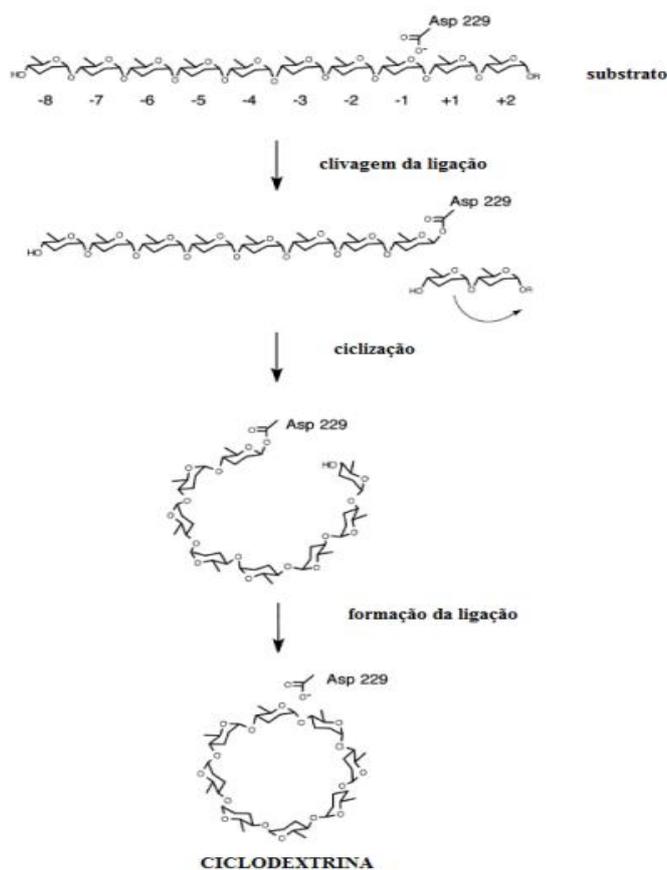


Figura 3 - Ciclicação catalisada pela CGTase. (UITDEHAAG *et al.*, 2002).

É muito importante identificar uma CGTase, capaz de sintetizar preferencialmente um tipo de CD a uma taxa de crescimento elevada (RAHMAN, *et al.*, 2006), já que a separação de um tipo específico de CD exige elevado investimento financeiro e leva muito tempo (BONILHA *et al.*, 2006). Portanto, se for possível obter uma CGTase com esta peculiaridade, seria possível produzir CDs a partir da imobilização desta enzima, diminuindo os custos de sua produção (WANG, *et al.*, 2006). Atualmente alguns métodos para produção industrial de CGTase têm sido estabelecidos e muitas CEPAs bacterianas selvagem ou geneticamente modificadas têm sido utilizadas na indústria para produção de diferentes tipos de CGTase (QI & ZIMMERMANN, 2005).

Devido a sua capacidade única de formar oligossacarídeos cíclicos (CDs), a partir de amidos, a CGTase, tem atraído grande interesse industrial. As CDs são capazes de formar complexos de inclusão com uma variedade de substâncias, melhorando suas propriedades físico-químicas tais como maior resistência química a fatores ambientais, maior solubilidade aparente e volatilidade reduzida (TARDIOLI *et al.*, 2006). Essa propriedade das CDs tem levado a um aumento em sua aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêuticas,

cosméticos, produtos agroquímicos, química, plásticos e outras (SZEJTLI, 1997; ALVES-PRADO *et al.*, 2002; CARNEIRO *et al.*, 2006). O avanço tecnológico na produção de CDs tem alcançado reduções significativas nos seus custos, todavia, várias das aplicações potenciais só poderão se concretizar em larga escala caso se consiga reduzir ainda mais o custo de obtenção da CGTase (MATIOLI, 2000; CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO, 2007).

Com intuito de melhorar as condições de cultivo, as modificações genéticas de diversas CEPAs e as modificações na própria enzima pela engenharia proteica, vários estudos vem sendo realizados. O interesse na produção em larga escala da CGTase, está diretamente ligado às possibilidades de sua aplicação industrial e na produção do principal produto obtido pela sua ação, as ciclodextrinas, além da busca pela melhoria na definição dos parâmetros necessários para aumentar a produção de γ -CD, uma vez que esta teria maior aplicação industrial, possibilitando encapsulação de moléculas maiores (AGUIAR 2001; COSTA *et al.*, 2007)

2.3 Amido

O amido é um polissacarídeo que pertence à classe dos carboidratos formado por meio da união de várias unidades de D-glicose, sendo a principal fonte de reserva das plantas, onde é armazenado na forma de grânulos semicristalinos e se formam em organelas subcelulares especializadas, os amiloplastos. Pode ser encontrado em sementes, tubérculos e raízes cujo tamanho e forma varia conforme a origem botânica. Os grânulos dos amidos podem medir de 0 a 100 μ m. Quanto sua forma, grânulos dos amidos dos cereais, como o milho são poliédricos, em relação ao dos tuberosos, como os de batata são elípticos e o das leguminosas como lentilhas, são ovoides (DE LEMOS, 2002; GOMES, 2003; MISHRA & RAI, 2005).

Quimicamente o amido constitui-se de duas moléculas de polissacarídeos ligeiramente diferentes, amilose e amilopectina, que somente podem ser evidenciados após solubilização e separação dos grânulos (LEAL & NETO, 2013). As proporções em que essas estruturas aparecem diferem em relação às fontes botânicas, variedades de uma mesma espécie e, mesmo numa mesma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta (ELIASSON, 2004; TESTER *et al.*, 2004).

A forma e a estrutura cristalina dos grânulos de amido podem variar de acordo com a origem botânica, a relação amilose/amilopectina, o grau de cristalinidade, a forma física e o tipo de processamento do amido, assim como interações ocorridas entre essa

substância e outros constituintes do alimento (BULÉON *et al.*, 1998; MYLLÄRINEN *et al.*, 2002). A técnica de difração de raios X é a mais utilizada para estudo do padrão da forma e estrutura dos grânulos.

A maioria dos amidos é composto de amilose entre 20 a 30%, uma cadeia não ramificada de unidades de D-glicose unidas por meio de uma ligação α -1,4'-glicosídica. A amilopectina forma os 70 a 80% restantes do amido, que consiste em longas cadeias de unidades de D-glicose unidas entre a ligação α -1,4-glicosídica, porém ela é uma molécula ramificada, com ligações cruzadas entre o carbono número 1 de uma unidade de glicose e o carbono número 6 de outra unidade (ligação α -1,6'-glicosídica), ocorrendo a cada 20 a 25 unidades de glicose (BRUCE, 2006; FRANCISCO JUNIOR, 2008; RUDNIK, 2008).

A amilose (Figura 4) é um polímero formado por cadeias lineares de unidades α -D - glucose as quais se encontram unidas por ligações glicosídicas α -1 \rightarrow 4, embora ocorram moléculas com leve grau de ramificação em α -1 \rightarrow 6. O número de moléculas de glucose varia de centenas a milhares, dependendo das espécies e apresentam um grau de polimerização de 200 a 10.000. Seu peso molecular situa-se em redor de 250.000 daltons (1.500 unidades de glucose anidra). A amilose é 100% degradada pela α -amilase, resultando na formação de β -maltose. (BULEÓN *et al.*, 1998; DENARDIN & DA SILVA, 2009.)

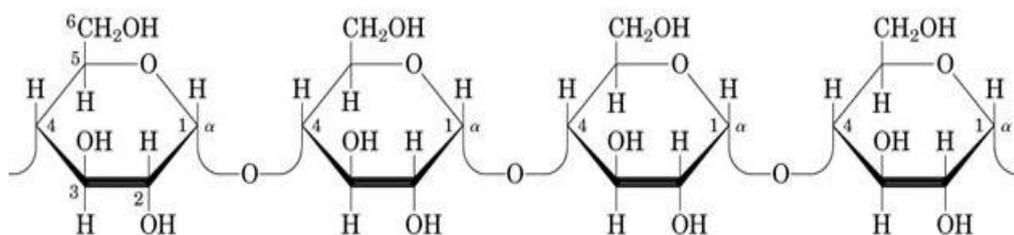


Figura 4 - Estrutura da molécula de Amilose (SUMERLY *et al.*, 2003)

In natura o grânulo é semicristalino com variação dos níveis de cristalinidade, associados à amilopectina, enquanto que as regiões amorfas são representadas pela amilose. Se a molécula de amilose estiver na forma cristalina ela apresenta uma conformação helicoidal. Este fato se deve à conformação das unidades de glicose, pois possuem um interior hidrofóbico (CIACCO & CRUZ, 1982). Segundo Parker & Ring (2001) as regiões lineares da cadeia de amilose formam um complexo azul escuro entre este polissacarídeo e o iodo em soluções aquosas à temperatura ambiente. Esta interação é a base para determinação da amilose.

A amilopectina (Figura 5) é uma molécula muito maior, com um único extremo redutor denominado cadeia C, possui em torno de 106 unidades de glicose por molécula, as unidades de glicose estão unidas por ligações glicosídicas α -1 \rightarrow 4, porém, cerca de 4 a 5% dessas unidades de glicose também estão envolvidas em ligações α -1 \rightarrow 6, criando pontes de ramificação (COULTATE, 2004).

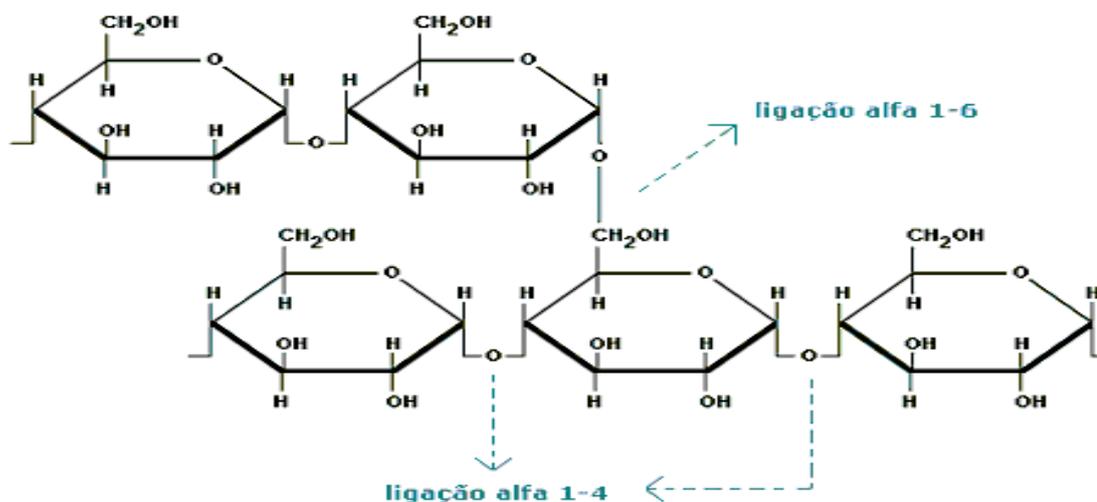


Figura 5 - Estrutura da molécula de amilopectina (SUMERLY *et al.*, 2003)

A amilopectina consiste de uma cadeia que contém um único extremo redutor, denominada cadeia C, a qual tem numerosas ramificações, chamadas cadeia B. As cadeias curtas de amilose sem grupos OH no carbono 6 comprometidos formam a cadeia A. Seu peso molecular vai desde 10^7 até 5×10^8 , fazendo com que as moléculas de amilopectina encontrem-se entre as maiores, senão a maior dentre as moléculas existentes na natureza (CIACCO & CRUZ, 1982; FENNEMA, 2000; DENARDIN & DA SILVA, 2009).

Os amidos podem ser hidrolisados por via química ou por via enzimática. Onde os hidrolisados por enzimas são os mais importantes amidos modificados comerciais, incluindo desde as dextrinas até os açúcares derivados de amido, além das ciclodextrinas que fazem parte do escopo deste trabalho.

2.3.1 Hidrólise do Amido

O processo de desdobramento total das moléculas de amilose e amilopectina, que ao se romperem se transformam em dextrinas cada vez mais simples e finalmente em glicose é chamado de hidrólise do amido. O amido não tem sabor, mas os

produtos de uma hidrólise intensa apresentam sabor adocicado (FRANCO *et al.*, 2001).

Durante a hidrólise enzimática do amido ocorre a produção de glicose, maltose, maltotriose e uma série de malto-oligossacárideos lineares ou ramificados conhecidos como maltodextrinas ou dextrinas (SZEJTLI, 1988; DEL VALLE, 2004; COSTA *et al.*, 2007). Nesse processo o produto resultante provém da quebra da ligação glicosídica simultaneamente com a adição de uma molécula de água. As dextrinas podem ser descritas então como substâncias heterogêneas, amorfas, higroscópicas, utilizadas em vários ramos da indústria como as de alimentos, papel, têxtil, cosmética, farmacêutica, química entre outras, principalmente pela sua característica atóxica (VILPOUX *et al.*, 2004).

As dextrinas são produtos da hidrólise parcial do amido com valores de dextrose equivalente (DE) menor que 20, e podem ser obtidas de amidos de diferentes fontes botânicas. A dextrose equivalente (DE) é uma medida que caracteriza a extensão da hidrólise do amido e também indica uma média do peso molecular. Conforme aumenta o grau de hidrólise, a média do peso molecular diminui e a DE aumenta. Esta é uma medida essencialmente empírica da quantidade de açúcar redutor presente no produto e é expressa na base seca (ALEXANDER, 1992). A dextrose usada como padrão é o amido (DE=0) e a glicose (DE=100) (MARCHAL *et al.*, 1999; DOKIC *et al.*, 1998; STORTZ & STEFFENS, 2004). Pode-se então definir a dextrina como todo material que tenha um DE entre 3 e 20. A DE reflete, o poder de redução, e indica sua estabilidade e funcionalidade.

Dextrinas consistem de uma mistura de sacarídeos com uma ampla distribuição do peso molecular entre polissacarídeos e oligossacarídeos e estão disponíveis no mercado na forma de pó, podendo também ser encontradas como soluções concentradas. Diferentemente do amido nativo, a dextrina é solúvel em água (CHRONAKIS, 1998). Em geral, as dextrinas são solúveis em água, possuem baixa densidade, e não possuem sabor de amido. Devido a estas propriedades são muito utilizadas nas indústrias de alimentos.

Para entendermos melhor as modificações que ocorrem na hidrólise do amido principalmente com relação à ação enzimática se faz necessário uma introdução sobre os açúcares redutores. Os açúcares redutores são provenientes de carboidratos redutores, ou seja, aqueles que possuem radicais aldeídos ou cetonas proporcionando um sítio ativo para reações. A glicose e a frutose apresentam terminais redutores sendo aldeídicos na glicose e cetônicos na frutose (VILPOUX *et al.*, 2004). A Figura 6 apresenta as moléculas de glicose e frutose respectivamente.

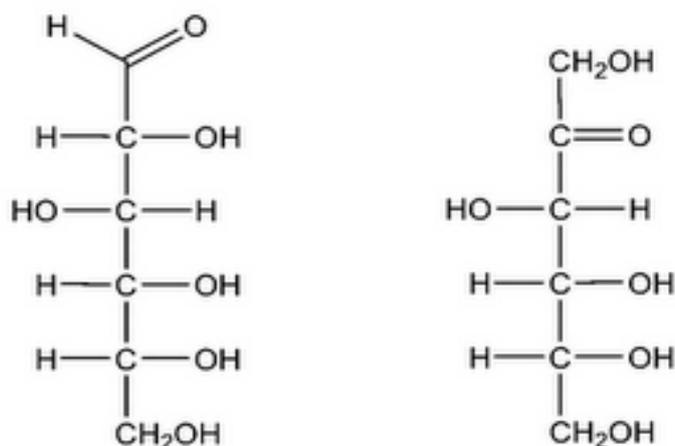


Figura 6 - Estrutura molecular dos isômeros glicose e frutose (ALLINGER, 1976)

As ligações entre duas moléculas de glicose origina uma molécula de maltose, como a ligação glicosídica se dá pelas reações entre o C1 de uma molécula e o C4 de outra, esta molécula resultante (maltose), apresenta apenas um radical reductor. Assim podemos dizer que à medida que ocorre a polimerização das unidades de glicose para a síntese do amido, as extremidades reductoras diminuem tornando o polissacarídeo menos reductor. Esse fator é importante, pois o número de extremidades reductoras nos dá uma ideia da polimerização do amido (VILPOUX *et al.*, 2004; DENARDIN & DA SILVA, 2009). A obtenção de alguns tipos de amido por hidrólise química é os mais utilizados, porém os hidrolisados obtidos por modificações enzimáticas são os mais valorizados.

Sumerly (1996) relata algumas vantagens da hidrólise enzimática em comparação à hidrólise ácida:

- A hidrólise ácida produz quantidades significativas de sais durante a neutralização, enquanto que em uma hidrólise enzimática os teores de sais são mínimos, permitindo o uso de resinas trocadoras de íons para a remoção dos sais formados e obtendo um xarope de condutância leve;
- O volume de carvão ativado utilizado para remover compostos coloridos, sabores e odores indesejáveis é representativamente menor na hidrólise enzimática;
- A linha de produção é mais simplificada, pois utiliza reatores unitários de liquefação, sacarificação e descoloração;
- A liquefação enzimática pode ser realizada a temperaturas baixas, durante alguns minutos, enquanto que a liquefação ácida tradicional exige cozimento sob pressão e altas temperaturas, isto representa um ganho de energia;

- Com uma mesma linha de equipamentos, pode-se fabricar uma gama completa de hidrolisados no processo enzimático.

A restrição para aplicação da tecnologia enzimática apresenta custos elevados das linhas de processamento, com mão de obra especializada, assim como laboratórios e análises mais sofisticadas (VILPOUX *et al.*, 2004; POLESI 2011; SANTOS *et al.*, 2008). A hidrólise se dá pelo desdobramento total das moléculas de amilose e amilopectina, que ao se romperem se transformam em dextrinas cada vez mais simples e finalmente em glicose. (FRANCO *et al.*, 2001). A hidrólise do amido tem por base o fato de que a ligação glicídica é estável em condições alcalinas, mas é hidrolisada em condições ácidas. Se o amido for tratado por ácidos minerais ou enzimas específicas, o resultado é um fracionamento do polímero com liberação de moléculas menores (FRENCH, 1984). Esse processo é chamado hidrólise e se for completa, dará origem apenas a glicose (VILPOUX *et al.*, 2004).

2.3.2 Hidrólise Ácida do Amido

A hidrólise química do amido é bastante utilizada no Brasil, em razão do seu baixo investimento. No processo químico, são usados ácidos minerais, tendo como principal produto pirodextrinas e glicose (FILHO & MENDES, 2003). Esse processo é utilizado nas empresas brasileiras para produção de xarope de glicose. Entre os açúcares produzidos como hidrolisados do amido, é mais difícil obter produtos de boa qualidade com processo ácido e calor. De acordo com Buckeridge *et al.*, (2010), o processo básico de hidrólise ácida, consiste em utilizar um ácido forte para atacar as ligações glicosídicas entre os monossacarídeos de um polissacarídeo.

Pode-se dizer de forma geral que amidos modificados por ácidos são aqueles que foram suspensos em uma solução ácida em temperatura abaixo de seu ponto de gelatinização (WANG & WANG, 2003). Esse tipo de modificação é muito utilizado nas indústrias, sendo que o primeiro a descrever este tratamento foi C.J. Lintner, em 1886. Lintner tratou uma suspensão de amido com uma solução de ácido clorídrico a 7,5% por sete dias a temperatura ambiente. Este derivado de amido é denominado amido de Lintner (CEREDA, 2003).

A hidrólise ácida ocorre quando uma alta concentração de amido (30-40g/100g de sólidos) é tratada com ácido, sob temperaturas inferiores aquelas de gelatinização (30-60°C, variando com a espécie botânica) durante uma ou várias h de reação, produzindo a dextrose como é conhecida comercialmente. Os ácidos minerais comumente utilizados são o

clorídrico e o sulfúrico (SANDHU *et al.*, 2007). A hidrólise do amido depende da consistência do grânulo, acidez do meio, temperatura e duração da hidrólise. A despolimerização via ácido não é seletiva, mas pode-se dizer que a formação de mono e oligossacarídeos dá-se pelo rompimento mais próximo ao final da cadeia. No primeiro estágio da hidrólise a formação de D-glucose, maltose e maltotriose é mais ou menos idêntica (BARROS *et al.*, 1984). Embora hidrólise ácida ainda seja muito utilizada, esta vem perdendo espaço para a hidrólise enzimática, que apresentam muitas vantagens, entre as quais a especificidade das enzimas, que proporciona a obtenção de produtos com propriedades químicas e físicas mais bem definidas (SEVERO; MORAIS; RUIZ, 2010).

2.3.3 Hidrólise Enzimática do Amido

A hidrólise enzimática permite maior controle da distribuição final de oligossacarídeos e é responsável pela obtenção dos mais importantes amidos modificados comerciais, enquanto a hidrólise ácida é inespecífica (GONÇALVES, 2006).

As enzimas amilolíticas podem ser classificadas pelo mecanismo de ação ou pela reação em si (ROBYT, 1984; FORGARTY, 1983; CEREDA & VILPOUX, 2003). Existem basicamente quatro grupos de enzimas utilizadas na hidrólise do amido. As endo e exoamilases que agem primeiramente nas ligações $\alpha(1-4)$; as desramificantes que agem exclusivamente nas ligações $\alpha(1-6)$ e as transferases que quebram ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ e as transferem para um receptor glicosídico, formando uma nova cadeia glicosídica. (GUPTA, 2003; FERNANDES *et al.*, 2007).

O ataque endo é efetuado pela α -amilase, responsável pela quebra de ligações do tipo $\alpha(1,4)$ internas ao polissacarídeo. Esta é a enzima que ataca o grânulo de amido intacto. Em seguida, as maltodextrinas formadas pela ação da α -amilase são atacadas pelas exo-glucanases. A exo-enzima β -amilase também pode atacar o amido, liberando unidades de maltose a partir do final não redutor do glucano e $\alpha(1-6)$ -glucanases atacam oligossacarídeos ramificados não atacados pela α -amilase, também liberando maltose. E finalmente o dissacarídeo é hidrolisado a glucose pela α -glucosidase (BECK & ZIEGLER 1989; BUCKERIDGE *et al.*, 2007).

De modo geral, as enzimas agem na superfície do grânulo de amido, provavelmente em uma imperfeição estrutural ou fissura e, depois, se estendem lateralmente formando cavidades cônicas. A ação contínua da α -amilase causa erosão nos grânulos que podem ser, eventualmente, dissolvidos completamente (FRENCH 1975; TORRES *et al.*,

2012). A maioria dos grânulos de amido são resistentes à hidrólise por amilases, pois diferentes tipos de amilases produzem diferentes graus de hidrólise nos grânulos de amido (TESTER; QI; KARKALAS, 2006; FRANCO *et al.*, 2010). Diferenças na suscetibilidade enzimática de amidos nativos são atribuídas à interação de muitos fatores, tais como, fonte do amido, tamanho do grânulo, extensão da associação molecular entre os componentes do amido, fração de amilose e amilopectina, tipo de cristalinidade (A, B ou C), complexo amilose-lipídeo, tipo de enzima, condições de hidrólise (concentração de amido, pH, temperatura), distribuição física do amido em relação aos componentes fibrosos, inibidores de α -amilase, porosidade e influência da secagem e condições de armazenamento (LI *et al.*, 2004).

Embora os métodos enzimáticos apresentem maior seletividade na hidrólise do amido, o uso de enzimas como amiloglicosidase ou glucoamilase, deve ser realizado com muito cuidado, pois frequentemente os extratos comerciais apresentam contaminação por celulases e outras glucosidases que liberam monossacarídeos de polímeros da parede celular (BUCKERIDGE *et al.*, 2007).

2.4 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são carboidratos complexos compostos de unidades de glicose (α -D-glicopiranoose), unidas por ligações tipo α -1,4, obtidas por modificação enzimática, sendo possível obter ciclização de seis, sete ou oito unidade de glicose dando origem a α , β , e γ CD. Em virtude da ciclização, as extremidades redutoras e não redutora se ligam de forma que todas as CDs são não redutoras. As (CDs) são malto-oligossacarídeos não redutores, produzidas pela hidrólise do amido pela CGTase (TONKOVA 1998; CEREDA *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2009; SEON *et al.*, 2009).

A base para obtenção das CDs é a dextrina, que é configurada na forma cíclica, sendo possível utilizar enzimas que cortam a molécula de amido em dextrinas e as ligam na forma de anéis simultaneamente (CEREDA *et al.*, 2004). As principais frações apresentam seis, sete ou oito unidades de α -1,4-D-glicopiranooses, sendo designadas como: α -ciclodextrina (ciclo-hexa-amilose, ciclomaltohexanose, α -CD), β -ciclodextrina (ciclohepta-amilose, ciclomaltoheptaose, β -CD), γ -ciclodextrina (ciclo-octa-amilose, ciclomalto-octaose, γ -CD), respectivamente (Figura 7). As quantidades relativas de cada uma dependem do tipo e fonte de enzima usada, podendo ser obtida pela presença de compostos orgânicos

(FOGARTY & KELLY, 1990; AGUIAR, 2001; BOOGAARD, 2003; FERREIRA *et al.*, 2009).

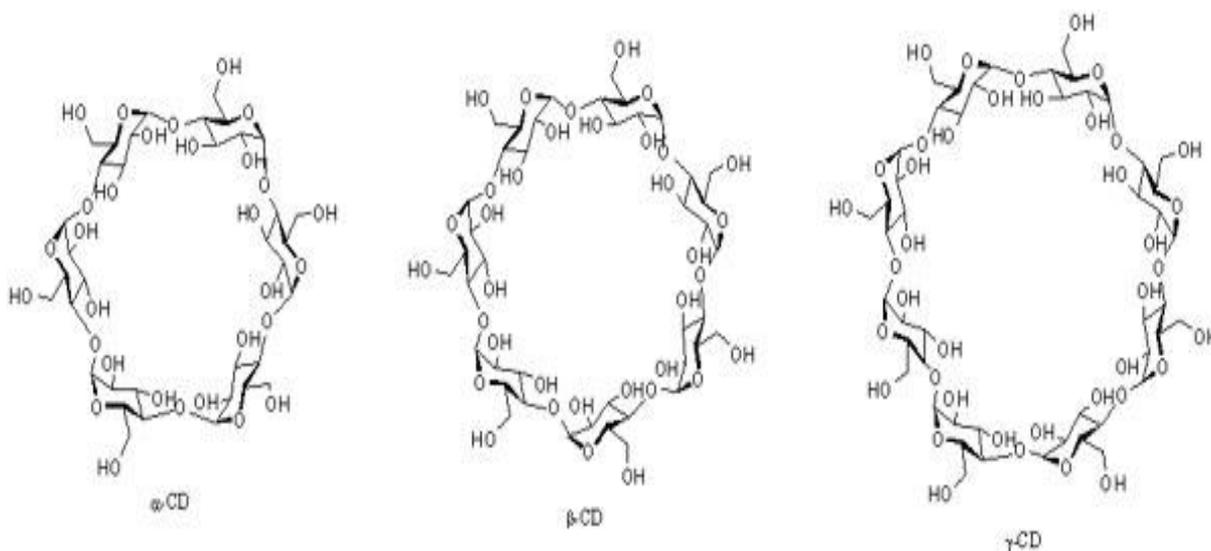


Figura 7 - Principais ciclodextrinas (α , β e γ -CDs, respectivamente, MACHADO *et al.*, 2008)

Embora mais raras, existem CDs com mais de oito unidades de D-glicose, French (1957) já mencionava a existência de CDs com até dez unidades de glicose. Entretanto, devido à baixa produção, baixa estabilidade e dificuldade de purificação, estas CDs não foram inteiramente caracterizadas. Também já foram caracterizadas e purificadas CDs com 9 a 19 unidades de glicose (DUCHÊNE *et al.*, 1991; LARSEN & ZIMMERMANN, 1999; MATIOLI *et al.*, 2000; ANDREAUS *et al.*, 2010).

Segundo Matioli *et al.*, (2000), as CDs apresentam sabor adocicado devido resíduos de glicose no seu anel, que são arranjados de maneira que o segundo grupamento hidroxil (C2-C3) é localizado no limite do anel e o primeiro grupamento hidroxil (C6) no outro limite, resultando em uma molécula com forma cilíndrica.

A estrutura cônica das CDs (Figura 8 e Figura 9) consiste em um exterior hidrofílico devido às hidroxilas primária e secundária das unidades de glucopiranosose, e uma cavidade central hidrofóbica devido ao oxigênio das ligações glicosídicas e aos hidrogênios das unidades de glucopiranosose (HODI *et al.*, 1991; MATIOLI *et al.*, 2000; VEIGA & SALTÃO 2001; CEREDA *et al.*, 2004). Essa conformação molecular faz com que as CDs apresentem um caráter hidrofílico no lado externo da molécula e os pares de elétrons livres dos oxigênios envolvidos em ligações glicosídicas são dirigidos para o interior da cavidade, proporcionando uma elevada densidade eletrônica e, por consequência, um caráter apolar (MATIOLI, *et al.*, 2000; VEIGA & SALTÃO 2001; BOOGAARD 2003; ANDREAUS *et al.*, 2010).

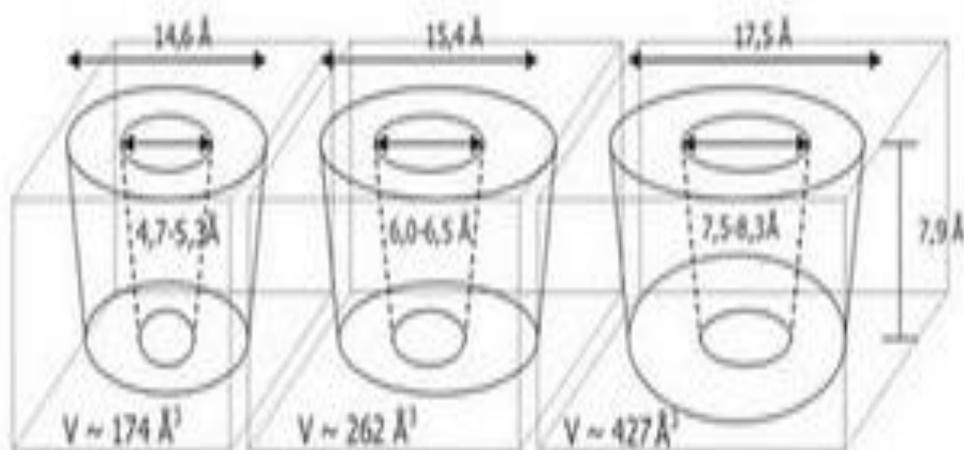


Figura 8 - Estrutura cônica das ciclodextrinas (α , β e γ -ciclodextrinas, respectivamente, MACHADO *et al.*, 2008)

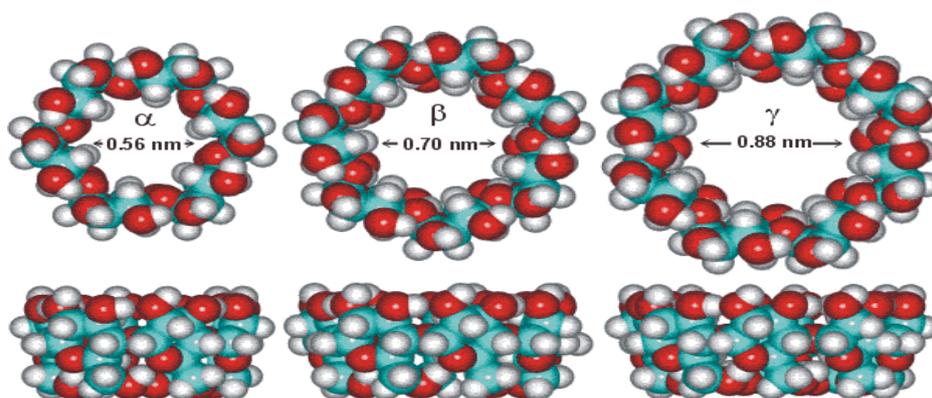


Figura 9 - Estrutura cônica das ciclodextrinas (α , β e γ -ciclodextrinas, respectivamente, CHAPLIN *et al.*, 2014)

A capacidade de formar compostos de inclusão em solução aquosa, na qual moléculas de dimensões compatíveis são incluídas dentro da cavidade da ciclodextrina sem formação de ligações covalentes é a sua propriedade mais notável (VEIGA & SALTÃO 2001; AGUIAR 2001, VEIGA *et al.*, 2005; ANDREAUS *et al.*, 2010).

A formação de complexos de inclusão com varias substâncias orgânicas e inorgânicas, que são encapsuladas na cavidade central da CD, podem formar cristais. Os complexos de inclusão são formados em soluções aquosas, permitindo assim, a investigação de substâncias hidrofóbicas muito importantes para os sistemas biológicos. Como possíveis efeitos da formação de complexos de inclusão sobre as moléculas inclusas, têm-se a estabilização de compostos sensíveis à luz ou oxigênio, estabilização de compostos voláteis, alteração de reatividade química, melhora da solubilidade, melhora de sabor e aroma (VAN DER VEEN *et al.*, 2000b, MACHADO *et al.*, 2008).

Devido o fato das moléculas de CDs apresentarem formas circulares, e não apresentarem extremidade redutora e não redutora elas são muito estáveis. Desta forma, não podem ser degradadas por enzimas com ação do tipo exonuclear, sendo que além das CGTases, apenas algumas poucas enzimas podem abrir o anel das CDs, além disso, com poucas exceções, as CDs não podem ser fermentadas (PARK *et al.*, 2000, MATIOLI, 2000; HASHIMOTO *et al.*, 2001).

A formação de complexos com compostos hidrofóbicos ou grupos funcionais está diretamente ligada à forma tridimensional e o tamanho das moléculas de CDs. Sendo que as dimensões das CDs (Figura 9) variam de acordo com o número de unidades de glicose e essa diferença repercute no diâmetro da cavidade interna, então cada CD mostra uma capacidade diferente de formação do complexo de inclusão com outras moléculas. A necessidade mínima para a formação desse complexo de inclusão é que a molécula hospede deve se adequar inteiramente, ou a menos parcialmente, dentro da cavidade da molécula (BEKERS *et al.*, 1991; MATIOLI *et al.*, 2000; VEIGA & SALTÃO, 2001; ANDREAUS *et al.*, 2010).

A solubilidade das CDs aumenta rapidamente com a elevação da temperatura. A solubilidade em diferentes solventes orgânicos também pode variar com a temperatura. A γ -CD tem uma estrutura não coplanar mais flexível, sendo a mais solúvel das três. (BEKERS *et al.*, 1991; MATIOLI *et al.*, 2000). A Tabela 2 apresenta algumas características físico-químicas das CDs mais estudadas.

Tabela 2 - Propriedades físicas e químicas das CDs mais estudadas (Adaptada de VEIGA & SALTÃO, 2001; ANDREAUS *et al.*, 2010)

	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidades de Glicose	6	7	8
Massa Molecular (g/mol)	972,86	1135,01	1297,15
Diâmetro Externo (Å)	14,06 \pm 0,4	15,4 \pm 0,4	17,5 \pm 0,4
Diâmetro da Cavidade (Å)	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
Altura do cone (Å)	7,9 \pm 1	7,9 \pm 1	7,9 \pm 1
Ponto de Fusão (°C)	278	298 – 300	267
Solubilidade em água (mol/L ⁻¹)	0,114 ^a 0,138 ^b	0,016 ^a 0,019 ^b	0,179 ^a

^a - a 25 °C° ; ^b - a 30 °C

As propriedades térmicas exatas das CDs dependem de fatores como, teor de água, da estrutura cristalina, do grau de aquecimento e também da composição atmosférica, embora não se tenha um ponto de fusão definido, sabe-se a partir de 200 °C as CDs começam a se decompor (MATIOLI, 2000; PASQUINI & PASQUINI 2008).

As extremidades da cavidade das CDs isolada são abertas de tal forma que o substrato pode entrar no anel da CD por ambos os lados. Em solução aquosa, a cavidade levemente apolar é ocupada por moléculas de água que são energeticamente desfavoráveis, dada a natureza da interação polar-apolar e, portanto, podem ser facilmente substituídas por um substrato que seja menos polar que a água (SZEJTLI 1998; MACHADO *et al.*, 2008).

Como o diâmetro da cavidade da α -CD é menor que da β -CD e pelo fato das forças de Van der Waals serem criticamente dependentes da distância entre as moléculas, logo, para um mesmo substrato, as forças induzidas pela complexação da cadeia estendida serão maiores para a α -CD que para a β -CD. Certamente as interações de van der Waals são dependentes tanto do tamanho quanto da forma do substrato incluso (SZEJTLI 1998; MACHADO *et al.*, 2008).

O substrato submetido à inclusão tem suas características significativamente alteradas. Este fato se deve as modificações na reatividade química do substrato, fixação de substâncias muito voláteis, melhoria na solubilidade de compostos, estabilização de substâncias sensíveis à luz, calor e oxidação, proteção da degradação de substâncias por micro-organismos, mascaramento de corantes ou pigmentos e atividade catalítica com substratos (MATIOLI *et al.*, 2000; FEET *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2008).

O aumento da solubilidade do substrato em solução aquosa é a propriedade mais importante da inclusão de um substrato pela CD, além disso, ocorrem também modificações nas propriedades espectrais do substrato, na reatividade do substrato incluído que é inicialmente hidrofóbico, e se torna hidrofílico sob complexação. E pode-se dizer também que volatilidade da molécula incluída, diminui significativamente (MACHADO *et al.*, 2008; ANDREAUS *et al.*, 2010).

A utilização de compostos de inclusão com ciclodextrinas apresentam potencial aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de fermentações e química fina, na preparação, separação e purificação, bem como encapsulação de produtos como fragrâncias, fármacos (esteróis) e liberação controlada de compostos biologicamente ativos (medicamentos e pesticidas). As CDs são capazes de formar complexos estéreo-específicos podendo ser empregadas na separação de enantiômeros. Assim como as enzimas, as

ciclodextrinas apresentam propriedades catalíticas específicas (FOGARTY & KELLY, 1990; SABIONI 1994; PSZCZOLA 1988, MATIOLI *et al.*, 2000; AGUIAR 2001; BERGAMASCO *et al.*, 2005; SANTORO *et al.*, 2006).

As CDs promovem efeitos benéficos como a proteção contra oxidação de lipídios (HAIYEE *et al.*, 2009), a redução ou a estabilidade de aromas (SEON *et al.*, 2009), a estabilidade de cores (PROVENZI *et al.*, 2006) e vitaminas e o aumento da solubilidade de drogas (CHO, 2006). Por essas razões, são amplamente utilizadas em indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticas e químicas (SINGH *et al.*, 2002; ABDEL-SHAFI *et al.*, 2009). Na indústria de alimentos atuam principalmente na encapsulação de substâncias, atuando na estabilidade de aromas, vitaminas, corantes e gorduras insaturadas, consequentemente estendendo o tempo de prateleira dos produtos (SZENTE, *et al.*, 2004; AZEREDO, 2005, MACHADO, 2008). Outra aplicação crescente na indústria alimentícia é a produção de sucos de frutas encapsulados em pó. Os sucos de frutas são produtos de alta demanda no mercado mundial, e sua produção sob a forma de pós tem sido muito visada (AZEREDO 2005).

Na indústria de cosméticos e produtos de limpeza as CDs agem encapsulando fragrâncias, promovendo estabilidade físico-química e reduzindo a velocidade da oxidação dos compostos (GAWANDE *et al.*, 2003; CENTINI, *et al.*, 2007; ANDREAUS, 2010).

Na indústria farmacêutica, o interesse da encapsulação ocorreu a partir da complexação do princípio ativo β -lactama, em medicamentos como a penicilina e amoxicilina (RAWAT, *et al.*, 2004; NAMAZI, *et al.*, 2009), pois estes eram pouco solúveis em água, sendo quimicamente ou fisicamente instáveis além de apresentarem sabor desagradável, o qual era mascarado pela utilização das CDs (LOFTSSON, *et al.*, 2007; LU, *et al.*, 2009; NAMAZI, *et al.*, 2009). As CDs também auxiliam na ruptura de bolsas de lipídeos em células, melhorando o quadro de doenças vasculares (RODAL, *et al.*, 1999; MATTERN, *et al.*, 2009). Segundo Veiga & Saltão (2001), as CDs melhoram a solubilidade dos fármacos, o que auxilia na taxa de incorporação do princípio ativo.

Um dos aspectos que seguramente reveste as CDs de grande importância para serem potencialmente aplicadas em processos industriais refere-se à melhoria da solubilidade dos substratos em água. O controle da solubilidade pode ser efetuado via seleção de uma CD adequada, sendo que a modificação dos grupos hidroxílicos na face externa da CD pode alterar pronunciadamente sua própria solubilidade (MACHADO *et al.*, 2008). As CDs são utilizadas como catalisador em reações químicas como ocorre na oxidação de compostos e

auxiliando na extração de um componente de uma mistura (ABDEL-SHAFI *et al.*, 2009; SASIKALA, *et al.*, 2009).

As preocupações crescentes nos últimos anos no que concerne ao respeito ao meio ambiente levaram a comunidade científica ao desenvolvimento de toda uma área de pesquisa que recebe a denominação de química verde (KHAN *et al.*, 1998; MACHADO *et al.*, 2008). Na despoluição ambiental, as CDs têm sido alvo de numerosos estudos, sendo utilizadas com sucesso como moléculas receptoras eficientes na remoção de poluentes lançados ao solo e também utilizadas na tentativa de evitar o efeito de substâncias tóxicas contidas no ambiente por meio da formação de complexos não tóxicos como dos resíduos industriais (OONNITTAN, *et al.*, 2009). Alguns compostos orgânicos são os maiores poluentes em água, podendo ser tóxicos ou carcinogênicos até em baixas concentrações. Com o aumento da tecnologia de remoção de poluentes orgânicos da água, as CDs chegam a remover de 47 a 58 % de compostos indesejáveis (SALIPIRA *et al.*, 2006).

Hanna *et al.*, (2006) têm utilizado β -CDs em água para o desenvolvimento de um método inovador para a despoluição de solos em áreas industriais, contaminados com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os estudos mostraram que o uso de CDs em água aumentou a capacidade de extração de HPAs em cerca de 200 vezes em comparação com a água pura.

As CDs vêm representando um papel de destaque em inúmeras áreas, tais como na montagem de sistemas de liberação controlada de fármacos, em terapia imunomodulatória, e em processos de encapsulação de gases apresentando importância comercial, ambiental e biológica (BERTELMANN & PLEYER, 2004; RUDKEVICH & LEONTIEV, 2004; YAMANOI, 2006). A interação do DNA com β -CDs devidamente acomodadas em polieletrólitos oferece a possibilidade de liberação controlada de diferentes fragmentos de DNA, abrindo caminho para numerosas aplicações potenciais (JESSEL, 2006). No campo da nanotecnologia, os estudos dos nanoagregados de CDs são bastante promissores. Nano-partículas injetáveis podem ser desenvolvidas para serem utilizadas como nanocarreadores inteligentes, hábeis para liberar fármacos em tecidos específicos e em terapia fotodinâmica (RIBEIRO & FLORES, 2005). Merece ainda destaque o uso de CDs no desenvolvimento de quadros de impressão supramoleculares, que são de interesse para a área de nanofabricação. Como visto existem muitas aplicações para as CDs. É precisamente na sua capacidade de ligação aos substratos que reside sua força para transformá-los e amplificar a sua ação (MACHADO *et al.*, 2008).

2.5 Condições de Cultivo Para Produção de CGTase

A produção de CGTase, normalmente é realizada em reator batelada com agitação, em condições aeróbias. Sendo que o tempo de cultura é dependente da velocidade de crescimento do micro-organismo. De modo geral pode-se dizer que o cultivo demora de 2 a 3 dias, em temperatura na faixa de 30 a 37 °C para micro-organismos mesófilos, superior a 50 °C para os termófilos. A faixa de pH pode variar de 6 a 10. O cultivo pode ser realizado em processos de fermentação tipo batelada, batelada alimentada ou em sistema contínuo. A produção da CGTase também pode ocorrer pelo cultivo do micro-organismo na forma livre ou imobilizada (MATIOLI *et al.*, 2000; MORIWAKI *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2007; CARMELO 2011).

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). O termo processo descontínuo alimentado para culturas de micro-organismos foi utilizado primeiramente por Yoshida *et al.* (1973) e Borzani *et al.* (2001).

A fermentação descontínua alimentada, ou batelada alimentada, é um processo em que um ou mais nutrientes são adicionados nas dornas durante o cultivo, sendo que um tempo final não alimentado é reservado para completar a fermentação (PEREIRA JR. *et al.*, 2008; NAVES *et al.*, 2010).

Para se contornar problemas como inibição/repressão, a batelada alimentada e suas variantes é bastante utilizada, pois possibilita a manutenção da concentração desses inibidores/repressores em níveis sub-inibitórios/sub-repressores, com implicações diretas no desempenho da célula. A técnica de batelada alimentada é definida como um modo de operação na qual um ou mais nutrientes necessários ao crescimento celular são adicionados ao biorreator, intermitentemente ou continuamente, sem que ocorra retirada de material durante a operação. A flexibilidade de operação oferecida por esta forma de condução é adequada a Bioprocessos em que o crescimento celular e/ou formação de produtos são significativamente sensíveis à concentração do substrato limitante. Técnicas de fermentação em batelada alimentada são adotadas à produção de várias enzimas e antibióticos, uma vez que a formação destas biomoléculas é muitas vezes sujeita à repressão pelo substrato (PEREIRA JR. *et al.*, 2008; FONTES *et al.*, 2008; LEMOS & STRADIOTTO 2012; DAMASO *et al.*, 2013).

Carvalho & Sato (2001) citam alguns fatores que devem ser levados em consideração na escolha do processo de batelada alimentada, sendo estes:

- Minimização dos efeitos de controle do metabolismo celular, pois quando se utiliza este processo é possível contornar alguns problemas que resultam na superprodução de subprodutos ou síntese de enzimas desnecessárias;

- Minimizar a formação de produtos de metabolismo tóxicos, que dependem do controle da velocidade de fornecimento de substrato ao sistema, pois assim é possível regular a velocidade de crescimento celular e a transferência de calor;

- Possibilidade de adequar o processo a condições operacionais, diminuir alguns problemas do processo tradicional como grande formação de espuma e inibição da levedura pelo substrato;

- Possibilidade de adicionar nutrientes durante o processo, sem efeito agressivo sobre a atividade das leveduras;

- Possibilidade de realizar estudo cinético, pois o processo permite manter baixos níveis de substrato por longos períodos, mantendo a concentração celular constante.

Segundo Carvalho *et al.* (1975) o processo descontínuo alimentado pode ser dividido em dois grupos, diferenciando apenas no controle do mecanismo de alimentação, sendo elas (SENE *et al.*, 2000):

- Processo descontínuo alimentado repetitivo onde em intervalos de tempo fixos retira-se uma fração de volume constante.

- Processo descontínuo alimentado estendido onde a concentração de substrato limitante é mantida constante no meio de fermentação pelo suprimento contínuo do nutriente.

Quando mudanças na concentração de nutrientes afetam a produtividade de um determinado metabólito microbiano, a utilização de um processo de fermentação descontínuo alimentado é uma técnica promissora, pois através dela a concentração de nutrientes alimentados a cultura líquida pode ser controlada voluntariamente pela taxa de alimentação (YAMANE & SHIMIZU 1980; CHOCIAI, 2002).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo tem como objetivo apresentar todos os materiais e equipamentos utilizados no decorrer do desenvolvimento deste projeto, bem como todas as metodologias empregadas para a síntese e análises na produção da enzima CGTase.

3.1 Materiais

3.1.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado é o *Bacillus firmus* CEPA 37 (Figura 10). Uma bactéria esporulada e alcalofílica, capaz de produzir a enzima CGTase por mecanismo extracelular. Isolado do solo brasileiro de plantação de mandioca por Matioli *et al.* (1998), segundo à qual apresentou maior atividade em testes de precipitação de ciclodextrinas com tricloroetileno (MORIWAKI 2009). A enzima produzida pelo *Bacillus firmus* foi identificada como β -CGTase por Matioli, onde após purificação, apresentou peso molecular de 77,6kD sendo utilizada na conversão de uma solução de maltodextrina 10% para ciclodextrina, apresentando um rendimento de 21,4% como β -ciclodextrina (MORIWAKI, 2009; SANTOS *et al.*, 2013).

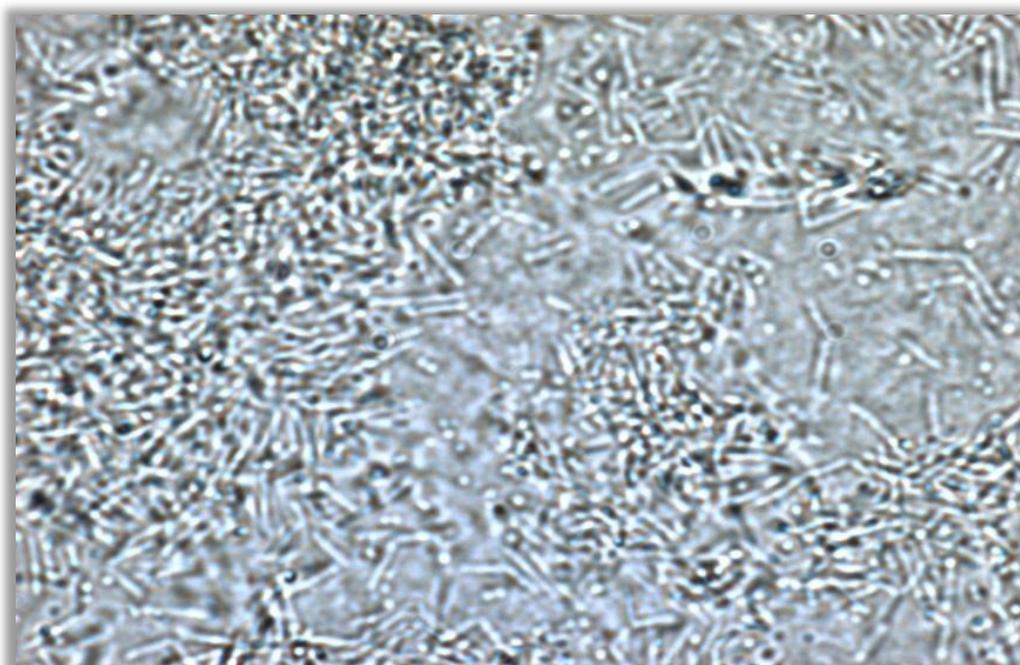


Figura 10 - *Bacillus firmus* CEPA 37 (Fonte: Autor)

Para os ensaios foram utilizadas duas amostras diferentes das CEPAS, inicialmente os experimentos foram realizados com a CEPA isolada em terra estéril e armazenada em refrigerador a uma temperatura aproximada de 5 a 7 °C, e posteriormente uma CEPA armazenada em terra estéril mantida em temperatura ambiente.

3.1.2 Substratos

O substrato utilizado como principal fonte de carbono para preparação do meio de cultivo foi o amido, sendo testados o amido solúvel da marca Sigma-Aldrich e uma marca comercial Bom Preço (Supermercados BIG).

O substrato utilizado para medições de atividade enzimática e estudo da síntese da enzima CGTase foi a Dextrina 10 (Maltodextrina), (Figura 11) , obtida do fornecedor Fluka, produzida por hidrólise enzimática de amido de milho com teor de umidade aproximado de 8,53% e peso molecular de 1672 g/gmol.

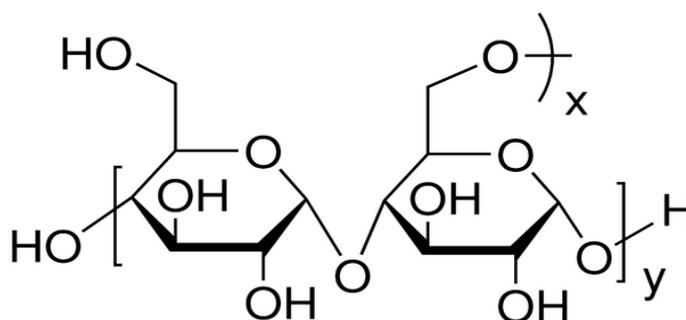


Figura 11 - Dextrina de amido de milho (Fonte: Sigma-Aldrich)

3.1.3 Fontes de Íons

Como fonte de íons utilizados para o estudo da síntese de CGTase nos ensaios de fermentação e para os meios de cultivos temos magnésio, potássio e sódio, na forma de sais: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Synth); K_2HPO_4 (Reagens); Na_2CO_3 (NEON).

3.1.4 Fontes de Nitrogênio

Como fontes de nitrogênio orgânico, utilizou a peptona bacteriológica do fornecedor HIMEDIA. A Peptona Bacteriológica é preparada por digestão enzimática de carne fresca selecionada.

Especificações:

- Nitrogênio total: mínimo 11.5 %
- Nitrogênio α -amino: mínimo 3 %
- Umidade: máximo 5 %
- Cinzas: máximo 10 %
- Cloreto de sódio: máximo 5 %
- pH (solução 1 %): 6.6 ± 0.5

Utilizou-se também o extrato de levedura do mesmo fornecedor. O extrato de levedura em pó é preparado secando o extrato obtido de células de levedura (*Saccharomyces*) especialmente cultivadas para este propósito. Os dados apresentados foram obtidos no site do fornecedor.

Especificações:

- Nitrogênio total: 11.5 %
- Nitrogênio α -amino: 4 %
- Cinzas: 13.0%
- Cloreto de sódio: 3.0 %
- Perda na secagem: 4.0 %
- Triptofano: presente

Conteúdo de vitamina:

- Tiamina (B1): 21 mcg/g
- Riboflavina (B2): 50 mcg/g
- Piridoxina (B6): 24 mcg/g
- Niacina: 300 mcg/g
- Ácido Pantotênico: 90 mcg/g
- Ácido Fólico: 20 mcg/g
- Biotina: 1 mcg/g

3.1.5 Padrões de Ciclodextrina

Para a preparação da curva padrão para as dosagens de Ciclodextrina foi utilizada a β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina, sendo a primeira obtida do fornecedor Roquette (Kleptose®), com teor de umidade de 15,479 % e a segunda do fornecedor Wacker-Chemie GmbH (Cavamax®), com teor de umidade de 6,8 %.

3.1.6 Reagentes de uso geral

- Ácido Dinitrosalicílico;
- Ácido Fosfórico-Orto 85 % P.A (NEON);
- Ágar (Invitrogen) Ágar (Invitrogen);
- Albumina Bovina (SIGMA A-2153), com teor de umidade de 1,6 %;
- Brilhante de Coomassie (Thermo Scientific)
- CaCl_2 (NEON)
- Enzima α -amilase (Termamyl 2X – Novozymes)
- Etanol ~ 95 % (NEON)
- Fenolftaleína Pura (Quimibrás)
- Frutose (Reagen)
- Glicose (Reagen)
- HCl (NEON)
- NaHCO_3 (Vetec)
- NaOH (NEON)
- Tris(hidroximetil)amino-metano (MERCK)
- Verde de Bromocresol (Biotec)
- Vermelho do Congo (Biotec)

Todos os reagentes utilizados apresentam grau analítico P.A

3.1.7 Equipamentos

- Agitador de Tubos em vórtex (MA 162 Marconi)
- Autoclave (Soc. Fabbe Ltda, Modelo 103)

- Balança Analítica (Shimadzu, Modelo AY220)
- Banho Termostático (Tecnal TE-184)
- Câmara de Fluxo Laminar Horizontal (Pachane PA-113)
- Capela (Permutation E.J Krieger & Cia Ltda. CE0703)
- Centrífuga Refrigerada (Jouan GR 2022)
- Computador LPB(Monitor Samsung, processador E-Star Intel Pentium 4)
- Cubetas para espectrofotômetro (Kartell S.P.A)
- Espectrofotômetro UV – VIS (Shimadzu 1203)
- Estufa (Quimis 6000)
- Estufa de Cultura (Fanem 002CB)
- Fermentador Bioflo III (New Brunswick Scientific)
- Incubadora Refrigerada com Agitação (Tecnal TE-422)
- Mantas Térmicas (Labstore 52)
- Motor para Sistema de Agitação(Fisatom 713D)
- pHmetro (Tecnal TEC-2)
- Pipetas Automáticas (Gilson ψ)
- Refrigerador (Consul 340S)

3.1.8 Biorreator BIOFLO III

O Biorreator BioFlo III (Figura 12) fornece um sistema totalmente equipado para realização de fermentações em batelada ou contínuo, tornando-o bastante versátil e capaz de controlar variáveis importantes no processo fermentativo como: pH, oxigênio dissolvido, agitação, temperatura, alimentação de nutrientes e controle eletrônico de espuma, operando em modo automático ou manual.

Com capacidade útil de 1,2 litros, é constituído de um prato superior de aço inoxidável e um tubo de vidro com flanges separáveis do prato inferior. O prato inferior é encamisado para a circulação de água responsável pelo controle de temperatura do vaso de fermentação. O sistema de agitação pode variar de 25 a 1000 rpm, sendo feita por um motor localizado na parte superior do vaso, responsável pelo movimento de pás conectadas ao vaso.

O sistema de controle de temperatura pode ser variado de 20 a 60 °C, onde a temperatura média é controlada por um sensor termopar, submerso em um poço térmico, o controle se dá por um controlador tipo PI (proporcional e integral).

O pHmetro utiliza um controlador tipo PID (proporcional integral derivativo), responsável pela operação de bombas peristálticas ligadas a um sistema contendo ácido (ácido clorídrico) e um contendo base (carbonato de sódio), controlados por um eletrodo de vidro podendo variar de 2,0 a 14 .

O oxigênio dissolvido pode ser controlado entre 5 a 95%, por um sensor de oxigênio dissolvido, onde o controlador tipo PID pode alterar a velocidade de agitação.



Figura 12 - Fermentador BioFlo III (Fonte: Artisan)

3.2 Metodologia

3.2.1 Condições de Cultivo

Antes do início da fermentação o micro-organismo *Bacillus firmus* CEPA 37 já isolado e armazenado em terra estéril, foi semeado de modo asséptico, em placas de petri contendo meio semi-sólido, cuja composição consta na Tabela 3 apresentada abaixo:

Tabela 3 - Composição do meio semi-sólido

Componentes (% p/v)	Semi-sólido
Peptona	0,5
Extrato de Levedura	0,5
MgSO ₄	0,02
K ₂ HPO ₄	0,1
Na ₂ CO ₃	1,0
Ágar	1,5

Após a semeadura, as placas eram mantidas em estufa incubadora a 37° C por um período aproximado de 48 h. Tempo suficiente para o desenvolvimento celular em estado vegetativo. A Figura 13 apresenta as placas de petri antes da semeadura contendo apenas o meio sólido, após o período de incubação do micro-organismo e após a raspagem das placas.



Figura 13- Placas de Petri antes da semeadura, durante a incubação do *Bacillus firmus* CEPA 37 e após raspagem (Fonte: Autor)

Após o período de incubação, as placas foram raspadas utilizando uma alça de platina, para remoção da massa celular presente, sendo então transferidas assepticamente para erlenmeyers 2000 mL contendo 800 mL de pré-inóculo cuja composição é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição do meio pré-inóculo

Componentes (% p/v)	Pré-Inóculo
Amido de milho	1,0
Peptona	0,5
Extrato de Levedura	0,5
MgSO ₄	0,02
K ₂ HPO ₄	0,1
Na ₂ CO ₃	1,0
α -Amilase	0,025

O pré-inóculo era então mantido em incubadora refrigerada (*shaker*) a 37 °C sob agitação de 150 rpm durante 48 h para adaptação do micro-organismo, após este período uma alíquota era retirada e transferidas para o meio de cultivo, cuja composição é apresenta na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição do meio líquido

Componentes (% p/v)	Meio de Cultivo
Amido de milho	2,5
Peptona	1,0
Extrato de Levedura	2,0
MgSO ₄	0,02
K ₂ HPO ₄	0,1
Na ₂ CO ₃	1,0
α -Amilase	0,025

Inicialmente os ensaios foram realizados em batelada utilizando erlenmeyers contendo o meio de cultivo, após estes ensaios os experimentos se deram apenas no fermentador BioFlo III. Os meios de cultivo eram incubados com uma alíquota de 10 % (v/v) do pré-inóculo e mantidos sob agitação de 150 rpm e 37° C durante todo período de cultivo, sendo retiradas amostras de 20 mL em intervalos de tempo regulares (8, 16 e 20 h). As Figura 14, Figura 15 e Figura 16 apresentam os meios de cultivo antes inoculação, após inoculação e após as primeiras 48 horas de cultivo.



Figura 14 - Meio de cultivo antes da inoculação (Fonte: Autor)



Figura 15 - Meio de cultivo após inoculação (Fonte: Autor)



Figura 16 - Meio de cultivo após 48 horas de fermentação (Fonte: Autor)

3.2.2 Determinação da Atividade Enzimática da CGTase (Hamon & Moraes)

Diversos métodos analíticos podem ser utilizados na determinação da atividade enzimática da CGTase, porém, devido a presença de outras enzimas como a pululanase ou α -amilase nos meios de fermentação onde são produzidas as CGTases, este

processo se torna difícil, portanto ainda não foi encontrado um método específico e totalmente confiável. Assim a determinação da atividade enzimática desta enzima baseia-se na formação da CD ou no consumo do amido (SZEJTLI, 1988; MATIOLI *et al.*, 2000; MORIWAKI *et al.*, 2009). A atividade enzimática das CGTase foi determinada pelo método espectrofotométrico estudado por Hamon & Moraes (1990) que utiliza o princípio das velocidade iniciais (COSTA *et al.*, 2007; MORIWAKI *et al.*, 2009; CARMELLO *et al.*, 2011). O método é descrito a seguir:

1 - A determinação da atividade enzimática da CGTase foi realizada nas condições:

- Temperatura = 50 °C para ativação da enzima;
- pH = 8 para garantir maior estabilidade da enzima;
- Baixa concentração de enzima e substrato para que a produção de β e γ -CD com o tempo ocorresse de forma linear.

2 - Preparou-se uma solução estoque de dextrina 1 %, pesando-se 1,0333 g de dextrina FLUKA e dissolvendo-a em 10 mL de solução de CaCl_2 (50mM) e 20 mL de tampão Tris-HCl (0,05 M e pH 8), completando volume para 100,0 mL com H_2O destilada, guardar num frasco;

3 - O ponto zero do teste foi obtido colocando-se um tubo de ensaio com rosca contendo 1,5mL de enzima diluída dentro de um banho a 100°C por um período de 5 minutos, para inativação da enzima. Na sequência foram adicionados 1,5 mL de substrato (solução de dextrina), permanecendo a mistura a 100°C durante mais 5 minutos. O tubo então foi resfriado à temperatura ambiente e armazenado para posterior leitura.

4 - Colocou-se então 7 tubos de ensaio com rosca, contendo 1,5mL de substrato em um banho térmico a 50°C durante 15 minutos (Figura 17).

5 - Foram adicionados 1,5 mL do meio enzimático diluído em cada um dos tubos de ensaio obedecendo ao tempo de reação que cada mistura deveria sofrer (do primeiro tubo até o sétimo o tempo de reação variou de 0 a 30 minutos). Assim, o primeiro tubo permaneceu zero minuto em um banho a 50°C, o segundo permaneceu cinco minutos, o terceiro permaneceu dez minutos, e assim sucessivamente até o sétimo tubo completando trinta minutos de reação.

6 - Após o tempo de reação, cada tubo foi colocado em banho a 100°C durante no mínimo 5 minutos, e logo após resfriado em água a temperatura ambiente para posterior dosagem de β -Cd e γ -CD para leitura pelo método espectrofotométrico.

Após a realização do procedimento, a atividade enzimática era calculada pela equação:

$$A = \frac{K \cdot V_R \cdot D}{V_E} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

$$A_e = \frac{A}{C_p} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

Onde:

A = Atividade enzimática em $\mu\text{moles de CD/ (min x mL)}$

A_e = Atividade específica em $\mu\text{moles de CD/ (min x mg de proteína)}$

C_p = Concentração de proteínas solúveis no meio enzimático em mg de proteína/mL

D = Diluição real da enzima

K = Inclinação da reta de concentração de CDs produzidas em função do tempo de reação (mmol / (L x min))

V_E = Volume da enzima diluída

V_R = Volume total de reação para o teste descrito.

Logo os valores de atividade e atividade específica serão expressos em U/mL e U/mg respectivamente.



Figura 17 - Preparação da solução de dextrina para análises de atividade (Fonte: Autor)

3.2.3 Preparação da curva padrão para dosagem de β -CD (Hamon & Moraes)

A fenolftaleína complexa-se com a β -CD e sofre descoloração proporcional a concentração de β -CD (VIKMON 1992; YOSHIDA *et al.*, 2010). A determinação da concentração de β -CD utiliza o método de dosagem espectrofotométrico com fenolftaleína (PHE) baseado na formação de um complexo entre o corante e a molécula de β -CD (Figura 18), que causa redução da absorção colorimétrica da solução no comprimento de onda de 550 nm. O descoloramento da solução, devido à complexação das moléculas de α -CD, β -CD e γ -CD com a PHE, é muito mais marcante para a β -CD sendo, portanto, este método preferencialmente utilizado para a determinação desta CD. Quando a forma ionizada da PHE (vermelha) é encapsulada no interior da β -CD, este corante é forçado a se manter na sua estrutura lactonada (incolor). Portanto, como o complexo β -CD-PHE possui uma absorbância diferente da PHE livre, é possível quantificar a β -CD presente na amostra (COSTA *et al.*, 2007; MORIWAKI *et al.*, 2010; YOSHIDA *et al.*, 2010).

Na preparação da curva de calibração de β -CD, os dados de absorbância, em função da concentração de β -CD, foram ajustados, levando em consideração a Teoria da Complexação da β -CD com a fenolftaleína, desenvolvida por Hamon & Moraes (1990) (MORIWAKI *et al.*, 2000; TARDIOLI *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2007; CARMELLO *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2013). A metodologia é descrita a seguir:

1 - Preparou-se uma solução estoque de fenolftaleína (3 mM) com etanol 95% completando o volume final para 100 mL.

2 - Preparou-se uma solução estoque de tampão carbonato (0,6M e pH 8,0) pesando-se 50,880 g de Na_2CO_3 e 10,080 g de NaHCO_3 , completando o volume final de 100 mL com água destilada, verificando-se o pH final.

3 - Preparou-se uma solução estoque de tampão “Tris-HCl” (0,05M e pH 0,8) pesando-se 6,055 g de Tris(hidroximetil)amino-metano dissolvido em água destilada e posteriormente adicionou-se lentamente, sob agitação constante, aproximadamente 2 mL de HCl concentrado até atingir pH 8,0.

4 - Preparou-se uma solução estoque de CaCl_2 (50mM), pesando-se 5,5547 g e completando-se o volume para 1000 mL com água destilada.

5 - Preparou-se uma solução estoque de β -CD (1 mM) pesando-se 0,13353 g de β -CD, sendo diluída em 20 mL de tampão “Tris-HCl” com 10 mL de solução estoque de CaCl_2 , completando o volume para 100 mL com água destilada.

6 - Utilizou-se 21 tubos de ensaio, colocando-se de 0 a 1,0 mL de solução estoque de β -CD, completando o volume para 1,0 mL com solução tampão (20 mL de “Tris-HCl” + 10 mL de solução estoque de CaCl_2 , completados para 100 mL de água destilada). Assim, o primeiro tubo de ensaio continha 0 mL de solução de β -CD e 1,0 mL de solução tampão, o segundo tubo continha 0,1 mL de β -CD e 0,9 mL de solução tampão, o terceiro tubo continha 0,2 mL de β -CD e 0,8 mL de solução tampão e assim sucessivamente até até o vigésimo primeiro tubo contendo 1,0 mL de solução de β -CD. Na sequência os tubos eram agitados em vórtice. Após este procedimento, retirou-se uma alíquota de 0,5 mL de cada uma destas diversas concentrações, transferindo-as para outros 21 tubos de ensaio.

7 - Preparou-se uma solução de trabalho de fenolftaleína (0,06 mM) com tampão carbonato (0,12 M), completando-se o volume final para 100 mL com água destilada.

8 - Aos tubos de ensaio contendo 0,5 mL de solução de β -CD, foram adicionados 2,5 mL de solução trabalho de fenolftaleína, agitando a mistura em vórtice.

9 - As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 550 nm, utilizando-se 3 mL de água destilada para leitura do auto-zero.

Os dados de absorvância em função da concentração de β -CD foram ajustados levando-se em conta a teoria da complexação da β -CD com fenolftaleína detalhado na Figura 18.

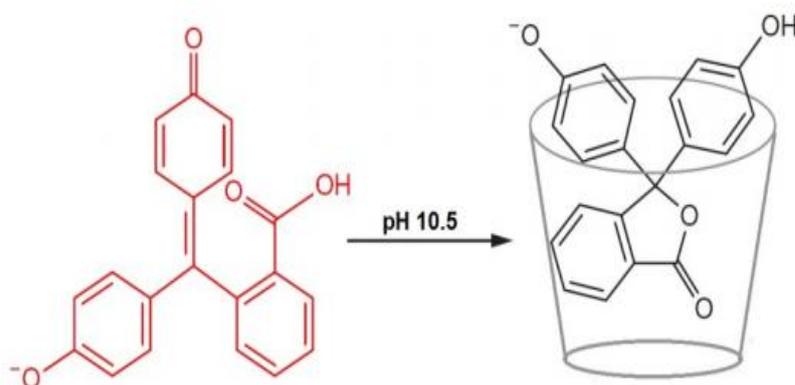


Figura 18 - Mecanismo proposto para descoloração da fenolftaleína na presença de β -CD, adaptado de KHALAFI & RAFIE (2013)

A Figura 19 a seguir ilustra a reação ocorrida, já preparada para leitura em espectrofotômetro.

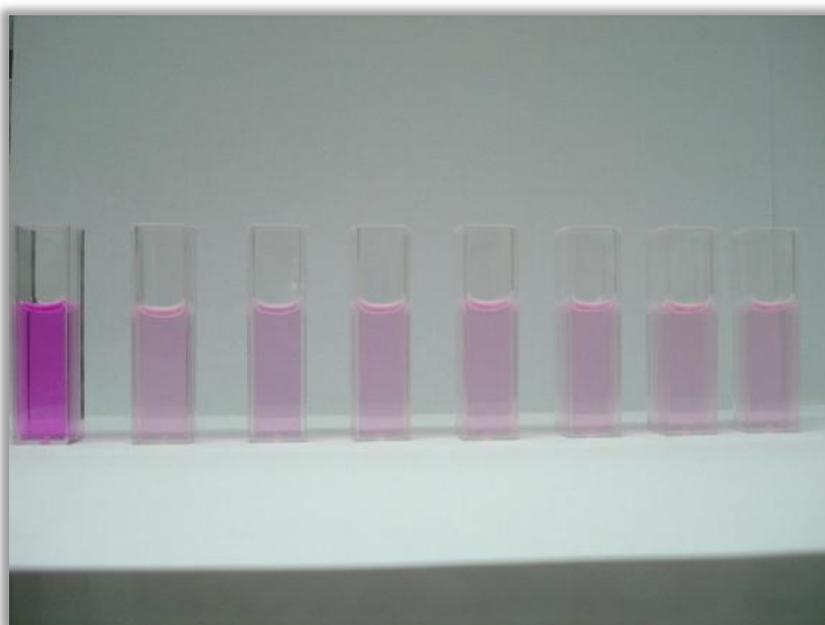


Figura 19 - Amostras após a reação com fenolftaleína (Fonte: Autor)

3.2.4 Preparação da curva padrão para dosagem de γ -CD (Hamon & Moraes)

A concentração de γ -CD foi determinada pelo aumento da absorção a 620 nm de uma solução de verde de bromocresol (VBC) após a complexação com γ -CD, (Figura 20), conforme descrito por Kato & Horikoshi (1984) e modificada por Hamon & Moraes (1990). O VBC é um corante específico para determinação de γ -CD, uma vez que este corante tem estrutura maior que a cavidade das CDs menores (α -CD e β -CD). A formação do complexo resulta na troca do equilíbrio de protonação, pois as suas formas ácida e básica têm diferentes estabilidades. Considerando que a reação acontece numa solução de pH 4,2, transição ácido-base do corante, a complexação promoverá um aumento no espectro de absorção com mudança na coloração do indicador (MAZONI & MORIWAKI *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2007; MORIWAKI *et al.*, 2009).

1- Preparou-se uma solução estoque de Verde de Bromocresol (5 mM e pH 3,0), pesando-se 0,360 g de VBC, adicionando-se 20 mL de etanol 96% e completou-se ao volume final de 100 mL com água destilada.

2- Preparou-se uma solução estoque de ácido cítrico 2 M, pesando-se 42,027 g de ácido cítrico, completando o volume com água destilada para 100 mL.

3- Preparou-se uma solução estoque de hidróxido de sódio (NaOH) 2 M, pesando-se 8,040 g e completando o volume para 100 mL com água destilada.

4- Uma solução estoque de γ -CD (2 mM) foi preparada, utilizando 0,2948 de γ -CD em água destilada completando-se o volume para 100 mL.

5- Em seguida pipetou-se de 0 a 0,5 mL da solução estoque de γ -CD em onze tubos de ensaio, completando o volume para 0,5 mL com água destilada. Então no primeiro tubo de ensaio utilizou-se 0 mL de de solução estoque de γ -CD e 0,5 mL de água destilada, no segundo tubo de ensaio utilizou-se 0,05 mL de solução estoque de γ -CD e 0,45 mL de água destilada e assim sucessivamente, agitando em vórtice .

6- Preparou-se uma solução de trabalho de VBC colocando-se 5 mL de VBC estoque + 2,5 mL de NaOH estoque + 5mL de ácido cítrico completando o volume para 50mL com água destilada.

7- Adicionou-se aos 11 tubos de ensaio (item 5) 2,5 mL da solução de trabalho de VBC, agitando-os em vórtice.

8- As absorvâncias foram determinadas a 620 nm, sendo o auto-zero obtido com 0,5 mL de água destilada + 2,5 mL da solução de trabalho de VBC.

9- Os resultados de absorvâncias em função as concentração de γ -CD foram ajustados por uma reta, sendo a equação obtida utilizada para o cálculo do teor de γ -CD produzido nos ensaios de γ -CGTase. A Figura 20 representa a inclusão do VBC na molécula de γ -CD.

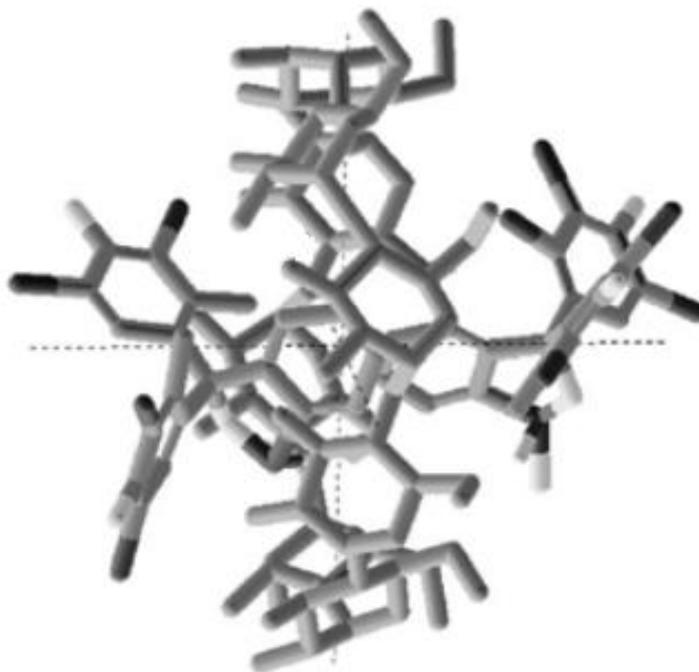


Figura 20 - Diagrama esquemático do modelo molecular da inclusão entre γ -CD e VBC adaptado de LIU *et al.* (2008)

3.2.5 Determinação do teor de proteína (Bradford)

A concentração de proteínas solúveis foi obtida por meio da dosagem do reagente de Bradford, que utiliza o corante azul brilhante de comassie (BRADFORD, 1976; MORIWAKI *et al.*, 2000; HIGUTI *et al.*, 2003; CARMELLO *et al.*, 2013). Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (ZAIA *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2009).

Foi utilizada como padrão a albumina bovina. A coloração do corante é convertida do vermelho acastanhado a azul, após sua complexação com a proteína. A intensidade da coloração é proporcional à quantidade de proteína presente na solução de enzima, a absorção máxima ocorre a 595 nm. A curva de calibração foi preparada como segue:

- 1 - Preparou-se uma solução estoque de reagente de Bradford, pesando-se 0,01g de azul brilhante de comassie, dissolvendo-o completamente em 5 mL de etanol 95%. É necessário garantir homogeneidade na dissolução do corante. Na sequência, acrescentou-se 10 mL de ácido orto fosfórico 85%, completando-se o volume para 100 mL com água destilada, obtendo-se uma coloração vermelho acastanhado;

- 2 - Preparou-se uma solução padrão de proteína, pesando-se 0,0102g de albumina bovina (SAB) 1,6% de umidade;

- 3 - A concentração de proteínas foi obtida a partir de amostras com concentrações conhecidas de 0 a 0,1 mg de proteína/mL de solução. Estas concentrações foram obtidas pipetando-se de 0 a 1,0 mL da solução de proteína padrão, completando o volume para 1,0 mL com solução tampão "Tris-HCl" (0,05M), em 21 tubos de ensaio. Para o primeiro tubo de ensaio tomou-se 0 mL da solução estoque de SAB e 1,0 mL da solução tampão "Tris-HCl", para o segundo tubo de ensaio tomou-se 0,05 mL de solução estoque SBA e 0,95 mL da solução estoque de tampão de "Tris-HCl" e assim sucessivamente até o vigésimo tubo de ensaio onde 1 mL da solução estoque SAB e 0 mL de solução estoque de tampão "Tris-HCl";

- 4 - De cada amostra diluída tomou-se uma alíquota de 0,3 mL, em duplicata, em seguida adicionou-se 3,0 mL do reagente de Bradford em cada uma das amostras;

5 - Após agitar todos os tubos de ensaio em vórtice, esperou-se dois minutos, lendo em seguida a absorção a 595 nm, sendo que o auto zero foi realizado com 3,0 mL de reagente de Bradford e 0,3 mL de água destilada, submetido ao mesmo tratamento das amostras;

6 - A curva padrão de absorbância foi obtida através dos pontos obtidos, fazendo o ajuste linear para os pontos, utilizando a equação obtida para o cálculo do teor de proteínas solúveis, presentes nos ensaios de CGTase. A equação encontra-se nos Anexos.

3.2.6 Determinação de Açúcares Redutores (DNS)

Os oligossacarídeos e os polissacarídeos são formados por moléculas de monossacarídeos unidas por ligações hemiacetálicas. Os testes de açúcares são baseados em reações de óxido-redução pelo grupo hidroxílico hemiacetalico do monossacarídeo, que pode reagir com íons e formar complexos coloridos (BOBBIO & BOBBIO 2005) ou por reações coloridas provenientes da condensação de produtos de degradação dos açúcares em ácidos fortes com vários compostos orgânicos como fenol e antrona. Os monossacarídeos são açúcares redutores. O teste de DNS (ácido dinitrosalicílico) baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarelo), que é reduzido a um composto colorido avermelhado, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, oxidando o monossacarídeo redutor como (MALDONADE *et al.*, 2013) como mostrada na Figura 21.

A concentração de açúcares redutores (AR) foi obtida através do aumento da absorção a 600nm de uma solução contendo o meio enzimático e o reagente DNS (ZANIN & MORAES, 1987; CARMELLO *et al.*, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2013).

Para obtenção da curva de calibração foram seguidas as seguintes etapas:

1 - Preparou-se uma solução de DNS (Anexos);

2 - Preparou-se um solução glicose + frutose a 1,0 g/L (Anexos), deixando em repouso por 3 h;

3 - Separou-se 21 tubos de ensaio colocando-se de 0 a 4,0 mL da solução estoque de glicose + frutose completando o volume para 4,0 mL com água destilada, assim primeiro tubo continha 0 mL da solução estoque de glicose + frutose e 4,0 mL de água destilada, no segundo tubo foi adicionado 0,2 mL da solução estoque de glicose + frutose e 3,8 mL de água destilada e assim sucessivamente até o ultimo tubo de ensaio contendo 4,0 mL da solução estoque de glicose + frutose;

4 - Prepararam-se outros 21 tubos de ensaio contendo 2,5 mL de reagente DNS e adicionando-se 0,5 mL de solução de glicose + frutose nas diversas concentrações conhecidas (preparadas no sub item 3);

5 - A mistura foi levada a um banho a 100°C em tubos com rosca por 10 minutos, sendo em seguida resfriada a temperatura ambiente;

6 - Adicionou-se 3,0 mL de água destilada à mistura, agitou-se em vórtice e determinaram-se as absorbâncias a 600nm em espectrofotômetro. A estabilidade da cor é mantida por 30 minutos.

7 - Fez-se o branco com 0,5 mL de água destilada e 2,5 mL de reagente DNS, o qual passou pelo mesmo procedimento para as amostras preparadas no subitem 5 e 6;

8 - O gráfico das absorbâncias em função da concentração de glicose + frutose foi construído, obtendo-se a curva de calibração para o reagente DNS. Os resultados e a curva estão demonstrados nos Anexos.

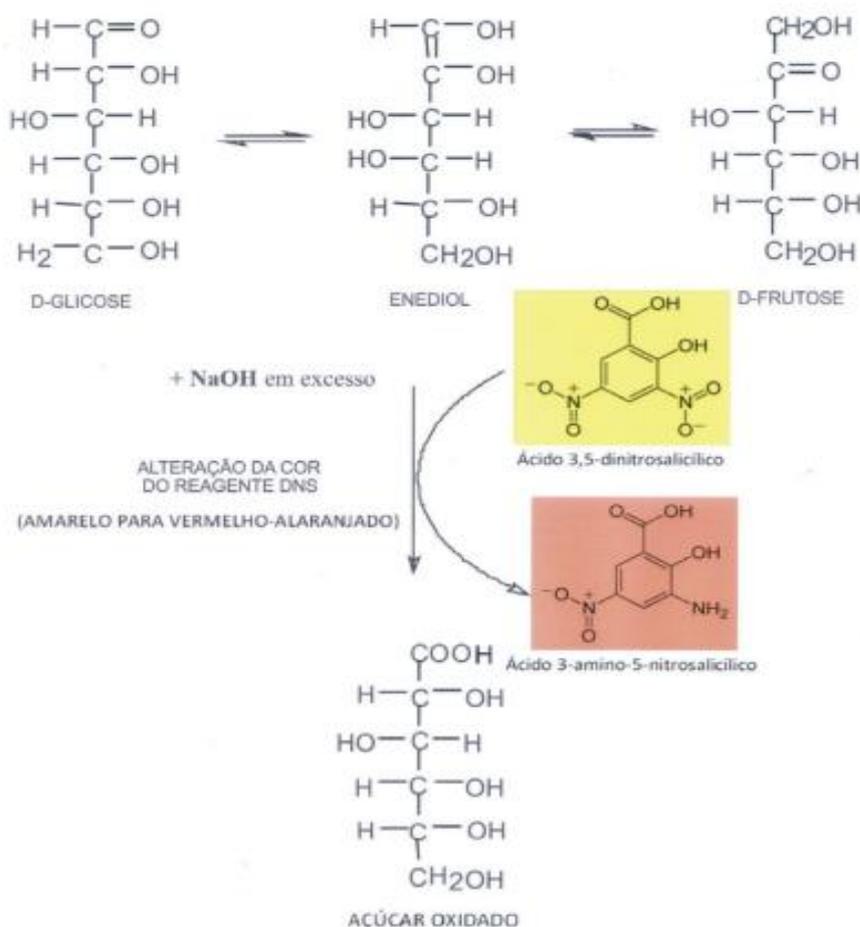


Figura 21 - Esquema das reações envolvidas no método do DNS (MALDONADE *et al.*, 2013)

3.2.7 Determinação de Açúcares Redutores Totais (DNS)

A determinação das concentrações de açúcares redutores totais (ART) foi feita do mesmo modo descrito no item 3.2.6 para os açúcares redutores (AR). Porém, antes do procedimento as amostras passam por um processo de hidrólise ácida conforme descrição abaixo (FALCONE & MARQUES, 1965; CARMELLO *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2013):

1 - Após centrifugação do meio de cultura coletado, 10,0 mL do meio enzimático foram transferidos para um balão de fundo chato contendo de 2,0 mL ácido clorídrico concentrado (38%) em cerca de 150 mL de água destilada (Figura 22);

2 - O balão era aquecido durante um período de 2 h e 30 minutos, com objetivo de realizar a hidrólise ácida do amido e ciclodextrinas presentes no meio, e após resfriado em temperatura ambiente;

3 - Após o resfriamento eram adicionadas gotas de solução de fenolftaleína à solução, sendo em seguida neutralizada com uma solução de NaOH (2M);

4 - A solução neutralizada foi transferida para um balão volumétrico e o volume completado para 200 mL;

5 - Na sequência, segue-se a medida do ART pelo método do DNS descrito no item 3.3.6 a partir do subitem 4.



Figura 22 - Hidrólise ácida do meio após centrifugação e separação do sobrenadante para análise de ART (Fonte: Autor)

3.2.8 Concentração Celular

A concentração celular foi determinada pelo aumento da absorção a 610 nm de uma solução contendo a biomassa centrifugada (Figura 23) e ressuspensa (OLIVO, 1985; MARQUES, 2004; CARMELLO *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2013). Neste trabalho foi utilizada a curva preparada por MARQUES (2004), visto que se trata do mesmo micro-organismo, conforme metodologia descrita abaixo:

Após a centrifugação, a biomassa obtida era ressuspensa em um volume de água destilada igual ao da amostra inicial e então efetuada a leitura em espectrofotômetro a 610 nm, sendo o branco, realizado com água destilada.

A determinação da concentração de biomassa está descrita a seguir:

1 - Amostras de 20 mL eram retiradas periodicamente (8:00 h, 16:00 h e 20:00 h) do meio de cultivo e centrifugadas por 25 minutos a 7000 rpm e 15 .°C;

2 - O sobrenadante era transferido para tubetes e guardado em geladeira;

3 - O precipitado era ressuspensa ao volume inicial da amostra (20 mL) com água destilada. Após agitação em vórtice do tubo contendo o precipitado ressuspensa, uma alíquota de 4,0 mL era transferida para cubeta descartável e realizado leitura da absorbância em espectrofotômetro a 610nm;

4 - Se caso houvesse necessidade a amostra era diluída antes da leitura;

Os resultados de absorbância foram convertidos em concentração de biomassa utilizando uma curva de calibração de biomassa obtida por Marques (2004), cuja equação relaciona absorbância e concentração de biomassa, dada pela equação listada abaixo:

$$Y = -0,0711446 + 0,492658.X \quad R^2 = 0,9823 \quad (\text{Eq. 3.3})$$

Onde:

Y= Concentração de Biomassa em g/L

X= Absorbância

R² é o coeficiente de correlação da curva ajusta

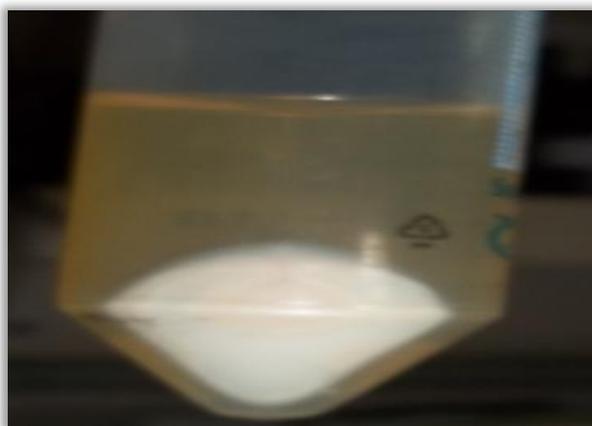


Figura 23 - Amostra do meio após centrifugação, onde pode ser verificando a separação da biomassa (Fonte: Autor)

3.2.9 Curvas de Calibração

As curvas de calibração para as medidas de β -CD e γ -CD, Proteínas Solúveis (PS), Açúcares Redutores (AR), Açúcares Redutores Totais (ART) encontram-se em Anexo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram realizados vários ensaios com o objetivo exploratório de estudar a produção da enzima CGTase utilizando o micro-organismo alcalofílico *Bacillus firmus* CEPA 37 em processos fermentativos realizados em biorreator operando de forma descontínua alimentada, para tanto foram necessários experimentos realizados de forma descontínua em incubadora com agitação (*shaker*) e em biorreator, para comparação de resultados.

4.1 Ensaio 1

Os primeiros conjuntos de ensaios tiveram como objetivo explorar meios com concentrações diferentes de amido e verificar a produção de CGTase através da formação de CDs, o comportamento do crescimento celular e o comportamento cinético do consumo de nutrientes do meio, para isto utilizou-se estudos prévios de outros autores que utilizaram o *Bacillus firmus* CEPA 37 (MATIOLI, 1997; MARQUES, 2004, CARMELLO 2012). Os ensaios padrões foram repetidos com objetivo de comparar os resultados com os resultados obtidos pelos autores citados. Na sequência foram realizados ensaios em condições diferentes com o objetivo exploratório de aumentar a produção de CGTase no meio de cultivo.

O primeiro conjunto de ensaios utilizou 3 concentrações diferentes de amido, como segue: 2,0 %, 2,5 % e 3,0 %, estes resultados foram comparados com os resultados obtidos por Marques (2004). A Tabela 6 apresenta os resultados.

Verificou-se que o meio contendo 2,5 % de amido apresentou valores mais altos (Tabela 6), conforme já havia sido verificado por Marques (2004), porém os resultados foram bastante inferiores quando comparados. Marques (2004) obteve 0,8400 U/mL de atividade máxima para β -CD enquanto a maior atividade para este ensaio chegou a 0,0024 U/mL para β -CD e 0,188 U/mL para γ -CD.

Tabela 6 - Comparação entre os diferentes meios de cultura

	A	B	C	M98
Amido	Solúvel 2,0%	Solúvel 2,5%	Solúvel 3,0%	Milho 2,5%
Peptona	1,0%	1,0%	1,0%	1,0%
Extrato de Levedura	2,0%	2,0%	2,0%	2,0%
MgSO ₄	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%
K ₂ HPO ₄	0,1% (MP)	0,1% (M)	0,1% (MP)	0,1% (MP)
Na ₂ CO ₃	1,0% (MP)	1,0% (M)	1,0% (MP)	1,0% (MP)
Volume do erlenmeyer	2000 mL	2000 mL	2000 mL	250 mL
Volume do meio	800 mL	800 mL	800 mL	100 mL
Razão V _{erl} /V _{meio}	2,5	2,5	2,5	2,5
Atividade Máxima (U/mL)	0,001* 0,0814**	0,0024* 0,188**	0,0018* 0,046**	0,8400*
Tempo de cultivo total (h)	96	96	96	72
Tempo de A máx. (h)	55* 0**	96* 23**	7* 0**	60

* β -CD; ** λ -CD

A, B,C (Autor)

M98 (MARQUES, 2004)

O conjunto do primeiro ensaio teve o intuito de tentar reproduzir resultados previamente obtidos, utilizando o meio de cultivo de Nakamura & Horikoshi (1976), considerado meio padrão e apresenta a seguinte composição em % (p/v) (MATIOLI, 1997; MARQUES, 2004; CARMELLO, 2012): 2,0 de amido solúvel, 0,5 de peptona, 0,5 de extrato de levedura, 0,1 de K₂HPO₄, 0,02 de Mg₂SO₄.7H₂O e 1,0 de Na₂CO₃. Embora não se tenha obtidos resultados aproximados para atividade enzimática de β -CD, este ensaio permitiu colher dados referentes à atividade enzimática, pH, concentração celular, açúcares redutores, açúcares redutores totais e proteínas solúveis, que serviram como base para os próximos experimentos.

4.2 Ensaio 2

O segundo conjunto de ensaios usou o meio padrão Horikoshi modificado, utilizando a concentração de amido solúvel de 2,5 % (p/v), devido ao fato dos resultados obtidos apresentarem valores mais altos na formação de γ -CD observados na Tabela 6. Este ensaio foi realizado em 2 conjuntos, sendo uma fermentação em incubadora com agitação (*shaker*) e outra simultânea em biorreator BIOFLO III, com realimentação do meio em 92 horas de fermentação.

A Figura 24 apresenta os perfis de AR e ART, onde pode ser verificado que após 50 horas de cultivo, os açúcares remanescentes estavam abaixo de 0,5 g/L, ou seja, apenas residual.

Observou-se neste ensaio que o pH chegou a aproximadamente 7,3 em 48 h de fermentação (Figura 25), sendo que o ideal é que seja mantido acima de 8,5, pois trata-se de um micro-organismo alcalofílico, valores de pH abaixo de 8,5 dificultam o consumo de açúcares pelo micro-organismo. A concentração celular chegou a 7,6 g/L em 72 h de fermentação (Figura 25), enquanto Marques (2004), atingiu 1,20 g/L em 120 h. A atividade específica máxima foi de 0,028 U/mg de proteína para β -CD em 59 h de cultivo e 4,14 U/mg de proteína para γ -CD em 80 horas de cultivo conforme Figuras 26 e 27.

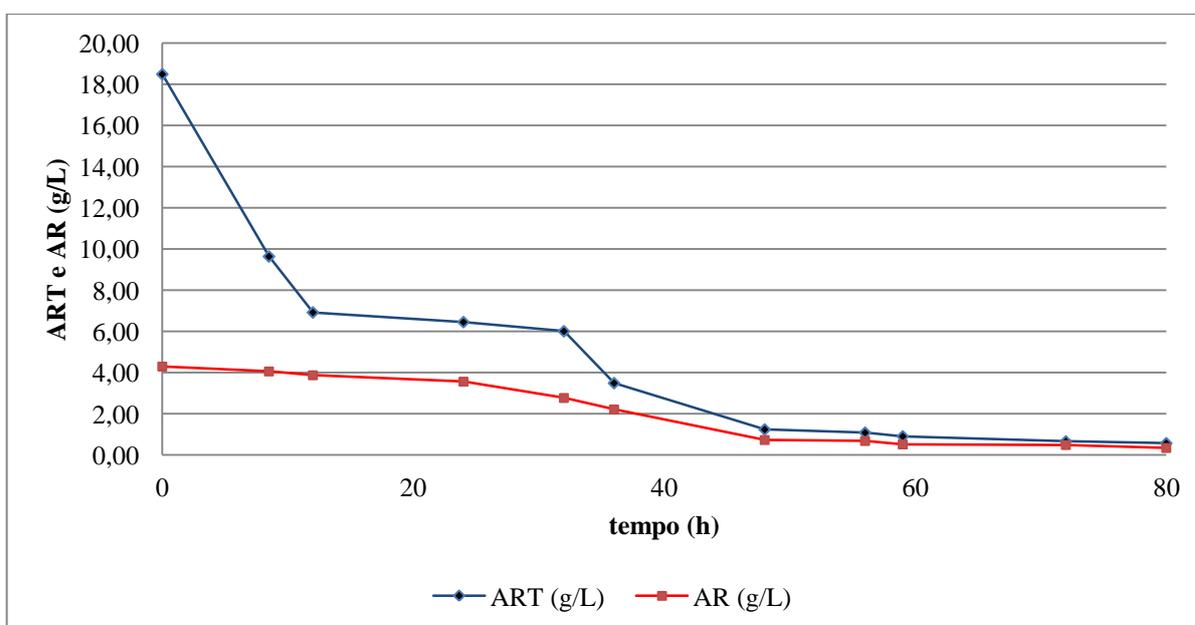


Figura 24 - AR e ART em função do tempo para fermentação realizada em *shaker*

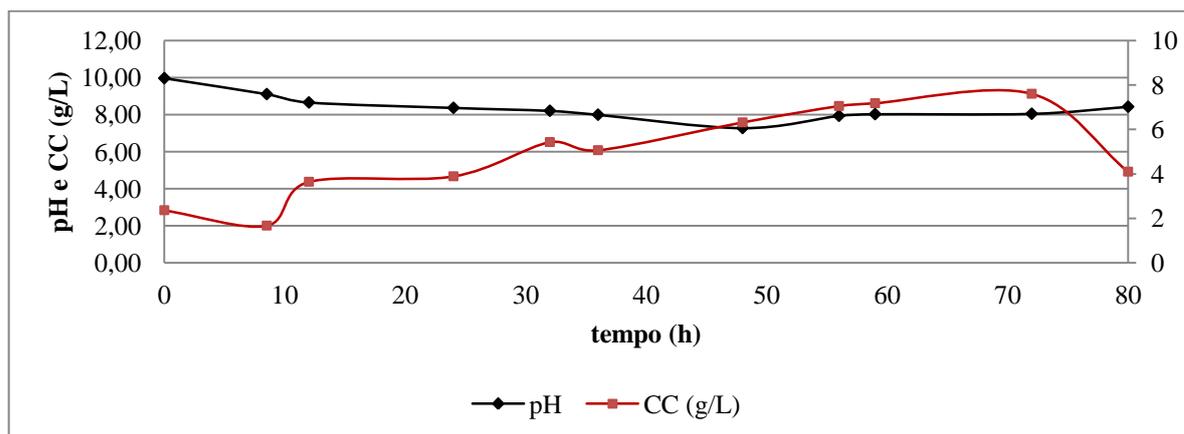


Figura 25 - Concentração Celular e pH em função do tempo para fermentação realizada em shaker

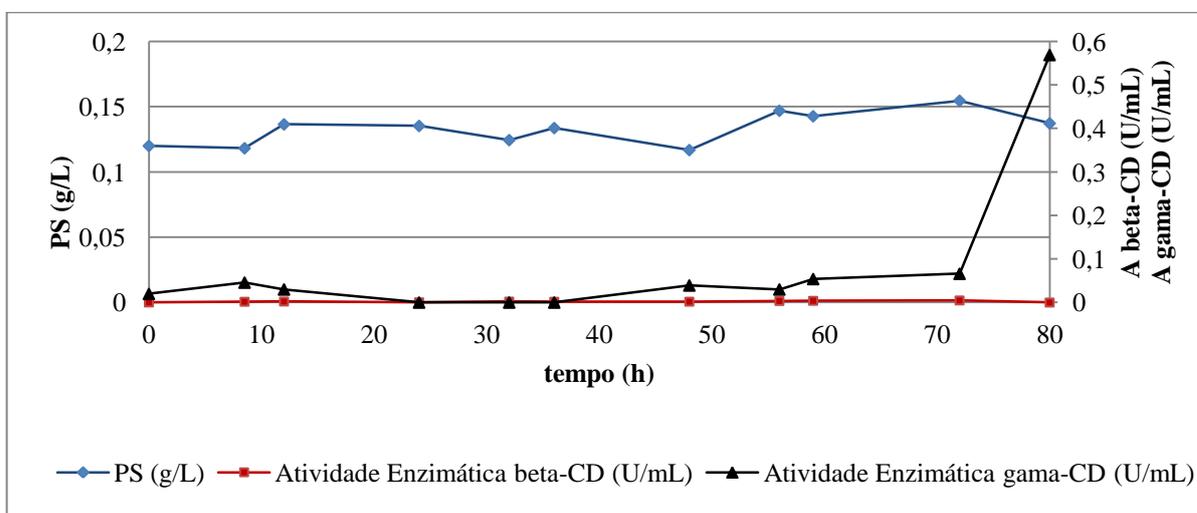


Figura 26 - Proteínas Solúveis e Atividade Enzimática em função do tempo para fermentação realizada em shaker

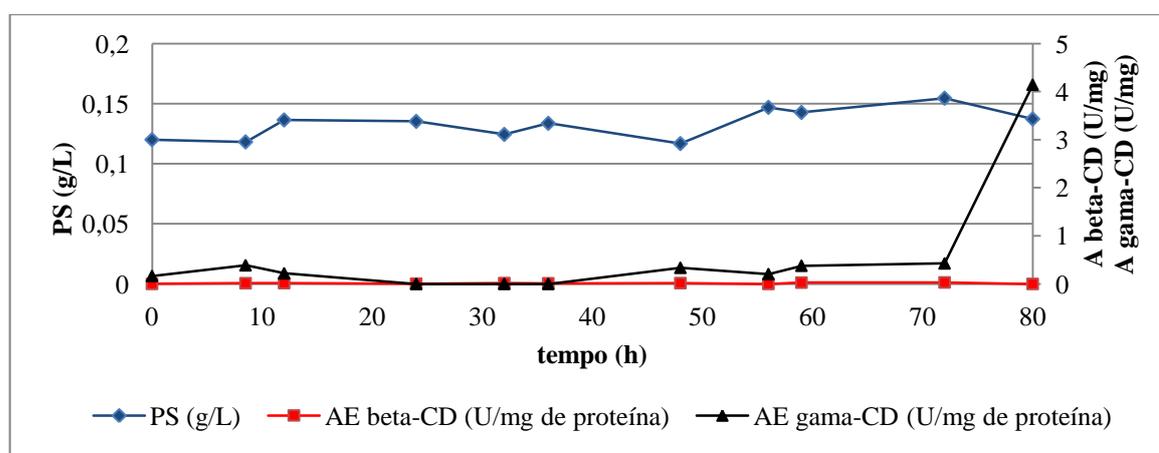


Figura 27 - Proteínas Solúveis e Atividade Enzimática Específica em função do tempo para fermentação realizada em shaker

Paralelamente ao ensaio realizado em *shaker*, foi também realizado um ensaio no reator Bioflo III.

O cultivo foi realizado em biorreator por um período de 340 h a 37 °C, 300 rpm, com controle de pH acima de 8,5 e aeração de 1 vvm (volume de ar por volume do meio por minuto). Após 48, e 96 horas de cultivo, uma alíquota de aproximadamente 50 % do meio de cultivo, foi substituída por uma solução de amido estéril (pulso) com concentração de 2,0 %, após as 200 horas de cultivo, uma alíquota de aproximadamente 70 % do meio de cultivo foi substituída por uma solução de amido estéril, com a mesma concentração do primeiro pulso. As setas indicam os pulsos de solução de amido inseridos no fermentador. Os volumes inseridos durante os pulsos foram equivalentes aos volumes de amostras retirados, no intuito de manter o volume original do meio de cultivo no início da fermentação.

Na Figura 28, pode-se notar que a concentração de açúcares estava muito baixa próximo das 200 h, por isso a necessidade do terceiro pulso ser mais representativo em termos de volume da solução de amido aplicada. A Figura 29, mostra que os valores de pH permaneceram acima de 8,5 durante as 340 h de cultivo do *Bacillus firmus* CEPA 37, uma condição essencial para o desenvolvimento deste micro-organismo alcalofílico. Tais resultados demonstraram a eficácia do tampão carbonato de sódio, que está relacionada com a adição de quantidades proporcionais do referido tampão ao amido de milho no meio de cultivo inicial. Quanto à concentração celular, observa-se um ligeiro aumento após os pulsos de amido aplicados, atingindo valores de 8,24 e 8,03 g/L em 59 e 254 h respectivamente.

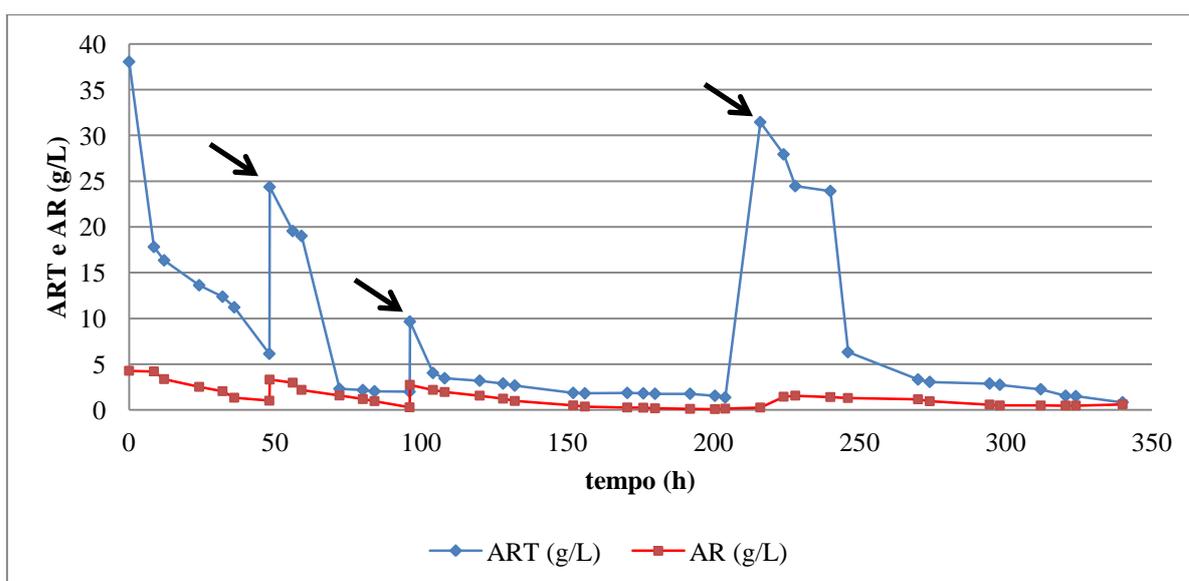


Figura 28 - Açúcares Redutores e Açúcares Redutores Totais em função do tempo para fermentação realizada em reator Bioflo III

É interessante notar que, quando os níveis de açúcares redutores estão baixos, há queda na concentração celular, e ao aplicar o pulso de amido, há recuperação na atividade de multiplicação celular, fato que já era esperado devido à disponibilidade de açúcares para o consumo. Nota-se também um rápido consumo de amido logo após a aplicação dos pulsos. As concentrações de açúcares redutores mantiveram-se baixas (inferiores a 5 g/L) durante todo o cultivo, e as concentrações de açúcares redutores totais reduziram acentuadamente, nas primeiras 48 horas e nos tempos de 48, 96 e 200 horas, quando a solução de amido foi adicionada ao meio de cultivo. Estes tempos de cultivo também foram acompanhados de ligeiro aumento e posterior redução das concentrações de açúcares redutores. Tais resultados evidenciam a atividade metabólica, uma vez que houve hidrólise do polissacarídeo em açúcares redutores, e a subsequente utilização destes açúcares pelo *Bacillus firmus* Cepa 37, em poucas horas após cada adição de amido.

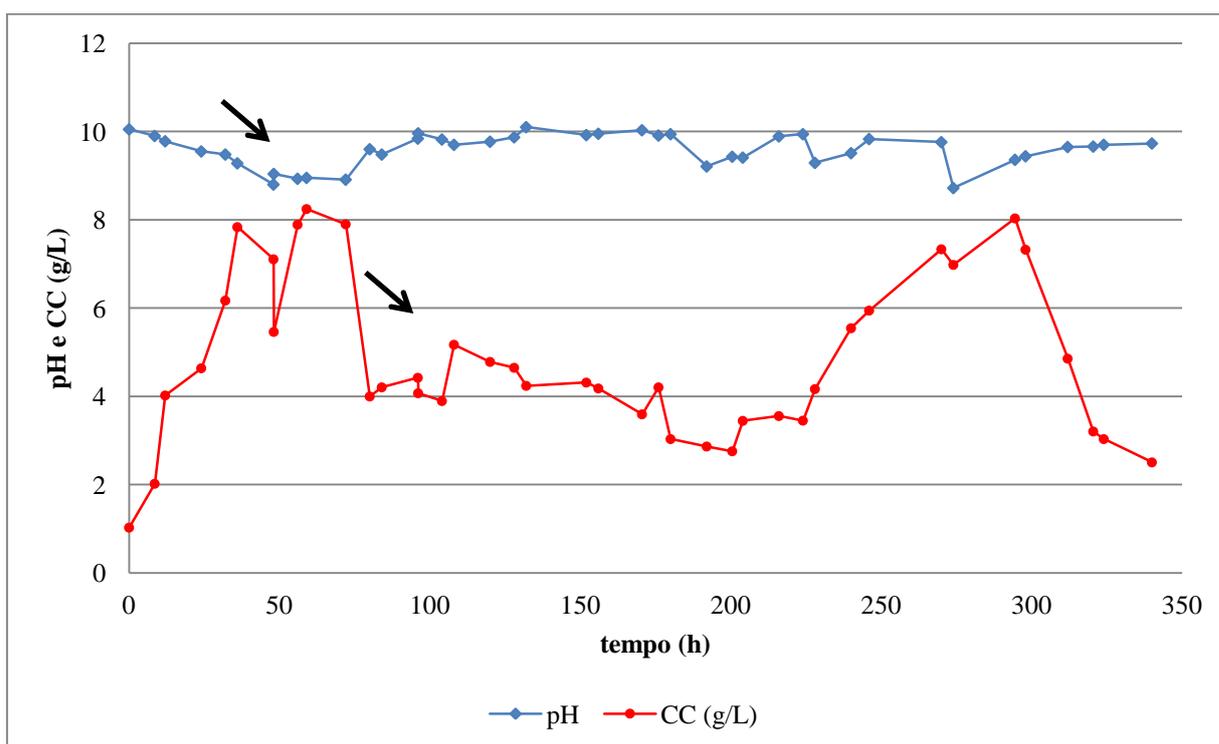


Figura 29 – pH e Concentração Celular em função do tempo para fermentação realizada em reator Bioflo III

Após o terceiro pulso de amido, verifica-se um aumento da concentração de proteínas solúveis após 200 horas de cultivo (Figura 30). Como a fermentação já está bem avançada, provavelmente há acúmulo de metabólitos secundários que prejudicam o

desenvolvimento celular, por isso, a simples suplementação de fonte de carbono, não garante uma recuperação prolongada do crescimento celular. Quanto às variações da concentração de proteínas solúveis no decorrer da fermentação, esta análise é importante, pois a atividade enzimática específica é dada pela razão entre a atividade enzimática e a concentração de proteínas solúveis no meio. Verifica-se que houve aumento da concentração de proteínas solúveis no início da fermentação, sendo que os valores apresentaram tendência de queda a partir 96h de cultivo. Como o *Bacillus firmus* apresentou recuperação da atividade de crescimento após os pulsos de amido, ou seja, depois de acrescentar fonte de carbono, é provável que o mesmo tenha consumido as proteínas solúveis disponíveis para utilizar como fonte de nitrogênio para seu crescimento, uma vez que este nutriente não foi repostado ao longo da fermentação.

Em relação às variações da atividade enzimática (Figura 30 e 31) é interessante notar que nestas condições de cultivo, o *Bacillus firmus* produziu maior quantidade de γ -CGTase do que β -CGTase, sendo que a atividade máxima para a γ -CGTase foi em torno de 0,11 U/mL. Com relação às atividades específicas, pode-se observar que a máxima atividade específica obtida foi de 1,4 U/mg de proteína com relação a γ -CD, observa-se também que, com relação a β -CD, os resultados obtidos foram muito inferiores, atingindo um valor máximo de 0,06 U/mg de proteína. Estes valores de γ -CD não se repetiram nos ensaios posteriores.

Houve três fases de maior produção de CGTase, ocorrendo logo após a suplementação de amido, após 48, 96 e 200 horas de cultivo, até 48 horas o micro-organismo produziu γ -CD, mas em menor quantidade, desta maneira, pode-se verificar um comportamento de produção da enzima parcialmente associado ao crescimento celular.

Outro fator que pode ter influenciado na menor produção de γ -CD no início da fermentação foi a elevada concentração de amido (próximo a 40 g/L), pois sabe-se que o amido exerce efeito inibitório na produção de CGTase, como o consumo de amido foi alto, e a suplementação se deu em menor concentração do que a inicial (20 g/L), o meio de cultura provavelmente passou a apresentar condições favoráveis para a produção de CGTase pelo *Bacillus firmus* CEPA 37. Por outro lado, a maior disponibilidade de amido no início da fermentação favoreceu desenvolvimento do micro-organismo, de maneira que a concentração celular atingiu valores próximos a 8,0 g/L em 36h de cultivo, antes do primeiro pulso de amido.

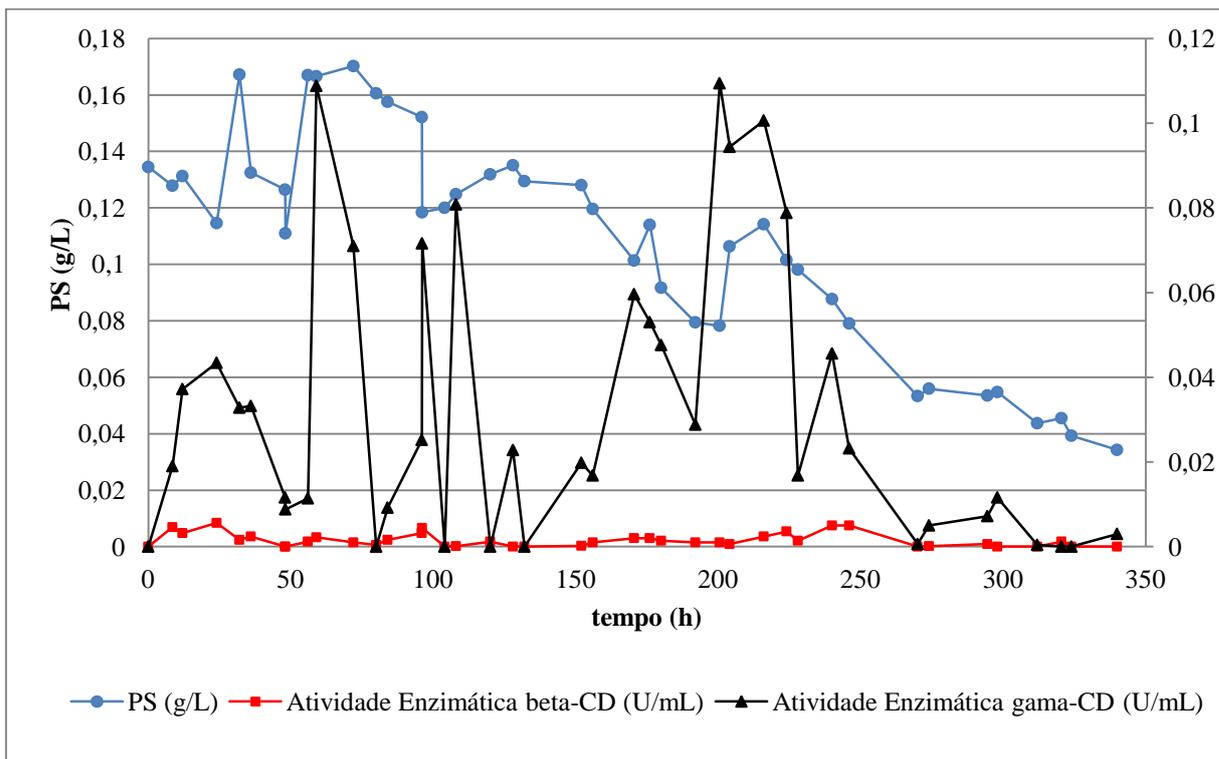


Figura 30 - Proteínas Solúveis e Atividade Enzimática em função do tempo para fermentação realizada em reator Bioflo III

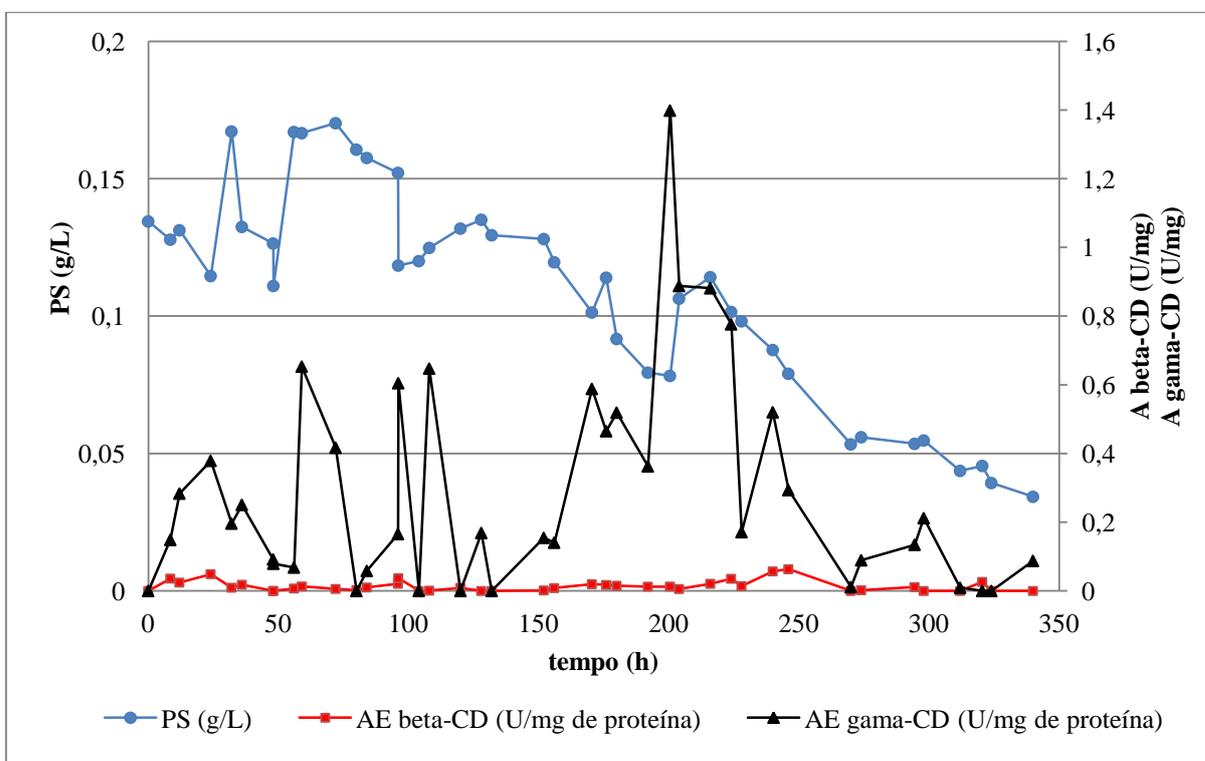


Figura 31 - Proteínas Solúveis e Atividade Enzimática Específica em função do tempo para fermentação realizada em reator Bioflo III

Desta forma, mesmo os experimentos sendo em caráter exploratório, buscando encontrar melhores condições de fermentação para alcançar melhores níveis na produção da enzima CGTase para a obtenção de Ciclodextrinas, permitiu concluir que os pulsos de amido aplicados resultaram em positivos sobre o crescimento celular, a quantidade de açúcares redutores disponíveis no início da fermentação e em cada pulso de amido foram rapidamente consumidos, evidenciando alta atividade metabólica pelo micro-organismo *Bacillus firmus* CEPA 37, da mesma forma, observa-se que houve bom crescimento celular. Isto evidencia que as condições de cultivo utilizadas favoreceram a produção de γ -CGTase ao invés de β -CGTase. Outro ponto importante que pode ser destacado é que pode ter havido consumo das proteínas solúveis do meio de cultura, como forma de reposição de fonte de nitrogênio, adotada pelo micro-organismo, o que também evidencia a elevada atividade metabólica do *Bacillus firmus* CEPA 37 nestas condições de cultivo.

4.3 Ensaio 3

O terceiro ensaio foi realizado somente no reator BioFlo III, utilizando o meio padrão de Horikoshi modificado, com 2,5 % de amido. Na Figura 32 pode ser verificado o comportamento do crescimento celular e das concentrações de açúcares em função do tempo, onde se obteve valor máximo de aproximadamente 8,32 g de célula/L em aproximadamente 31 h de cultivo. Como não houve reposição do meio de cultura, após 23 h de fermentação as concentrações de açúcares redutores mantiveram-se de forma residual (0,28 g/L), até o final das 76 h de cultivo.

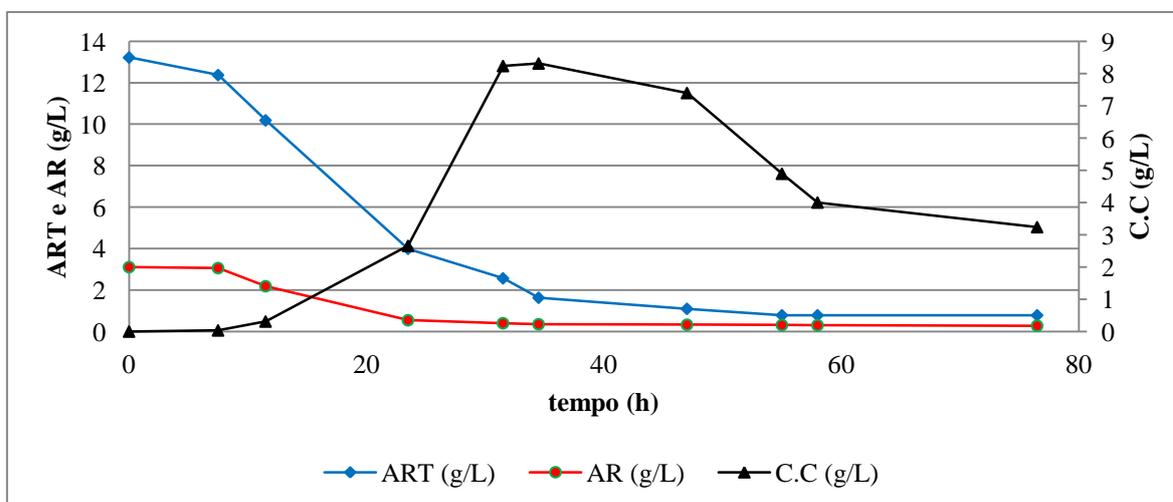


Figura 32 - Açúcares Redutores e Concentração Celular em função do tempo para fermentação realizada em reator Bioflo III

Como pode ser observado na Figura 33, não ocorreram grandes variações no pH, mostrando eficácia do tampão carbonato, mantendo-se muito próximo de 10, sem necessidade do controle automático disponível no reator BioFlo III.

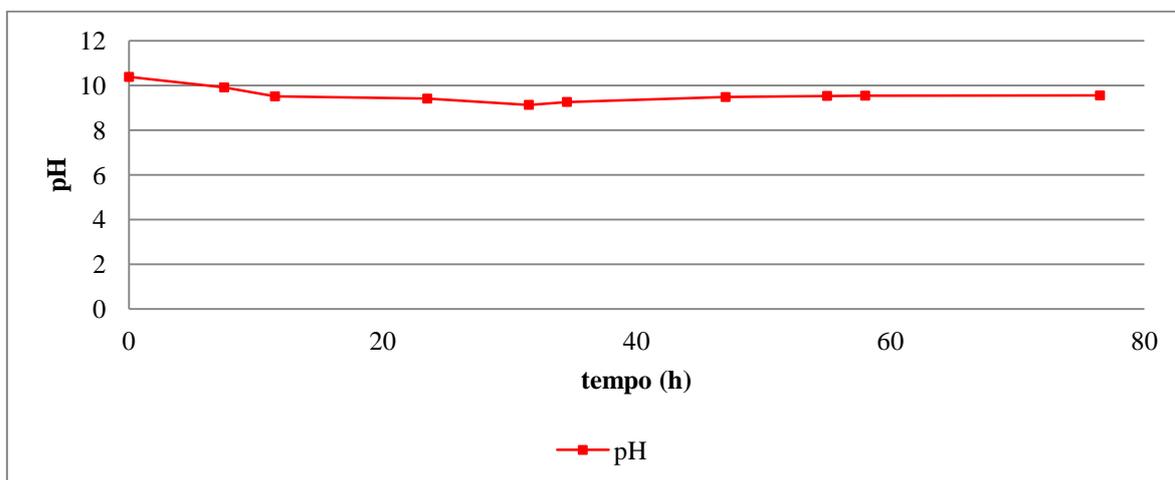


Figura 33 - pH em função do tempo para fermentação realizada em reator Bioflo III

A Figura 34 ilustra os valores obtidos para Atividade Enzimática com relação a β , γ -CD e proteínas solúveis. Os valores para β -CD foram mais representativos, chegando a 0,12 U/mL em 47 h, embora ainda tenham se apresentado bem abaixo de valores apresentados por Marques (2004) e Santos (2013), onde a segunda autora atingiu valores máximos de 0,22 U/mL em 24 h de cultivo, utilizando 2,0% de amido solúvel e extrato de levedura.

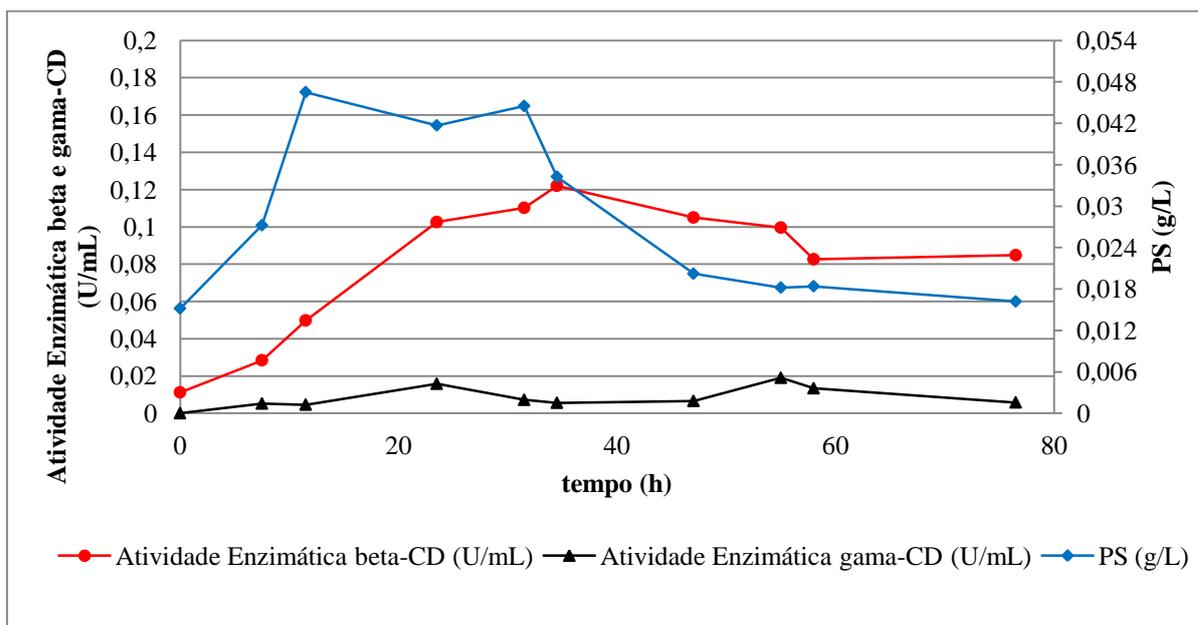


Figura 34 - Proteínas Solúveis e Atividade Enzimática em função do tempo para fermentação realizada reator em Bioflo III

Na Figura 35, pode se observar o perfil das atividades enzimáticas específicas para β e γ -CD, onde nota-se que β -CD tem um comportamento ascendente até o final do cultivo (80 h), aumentando em função da diminuição das proteínas solúveis e a γ -CD apresenta um comportamento praticamente residual também aumentado devido a diminuição das proteínas solúveis. Quando comparadas aos resultados das proteínas solúveis com resultados anteriores, estas apresentaram valores baixos (aproximadamente 0,05 g/L).

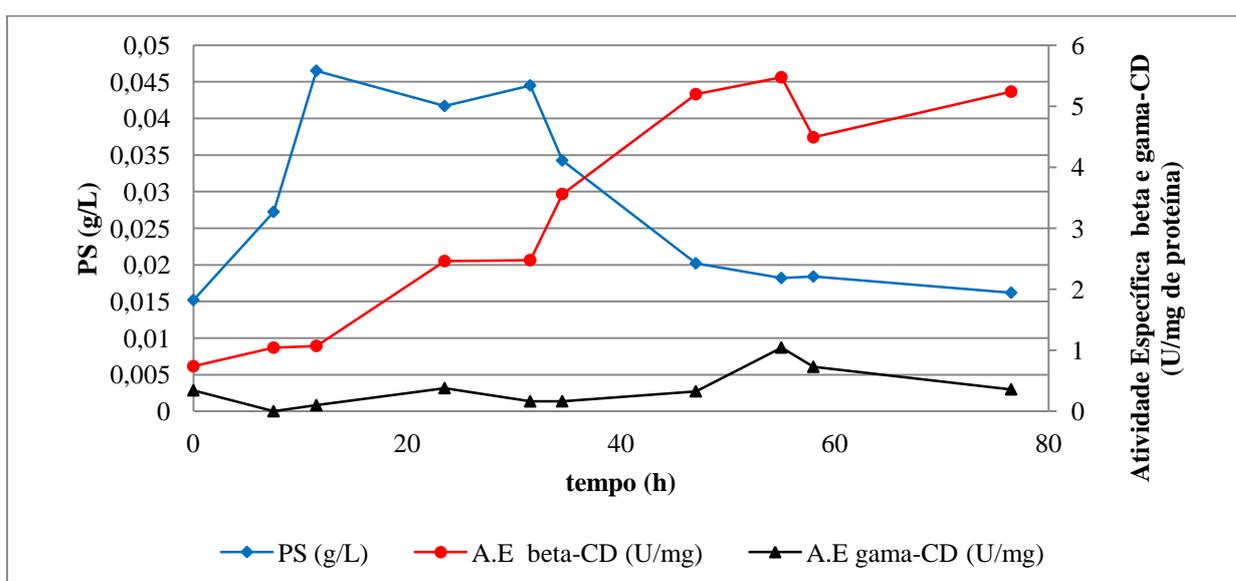


Figura 35 - Proteínas Solúveis e Atividade Enzimática Específica em função do tempo para fermentação realizada em reator Bioflo III

4.4 Ensaio 4

Para este ensaio foram realizados 3 fermentações sequenciais em reator BioFlo III, nas mesmas condições. O meio padrão utilizado foi o de Horikoshi modificado, reduzindo a concentração de extrato de levedura para 1%, com objetivo exploratório de verificar a influência da concentração do extrato de levedura no meio. Embora os ensaios tenham sido realizados nas mesmas condições conforme já citado anteriormente, os resultados obtidos foram distintos no que diz respeito às concentrações de Proteínas Solúveis, Atividade Enzimática e Atividade Enzimática Específica. As Figuras 36 e 37, apresentam os perfis referentes às concentrações de Açúcares Redutores e Açúcares Redutores Totais em função do tempo de cultivo. Assim como no ensaio anterior, não foi realizado reposição do meio. Em aproximadamente 60 h de cultivo, os açúcares redutores já haviam praticamente sido consumidos pelos micro-organismos.

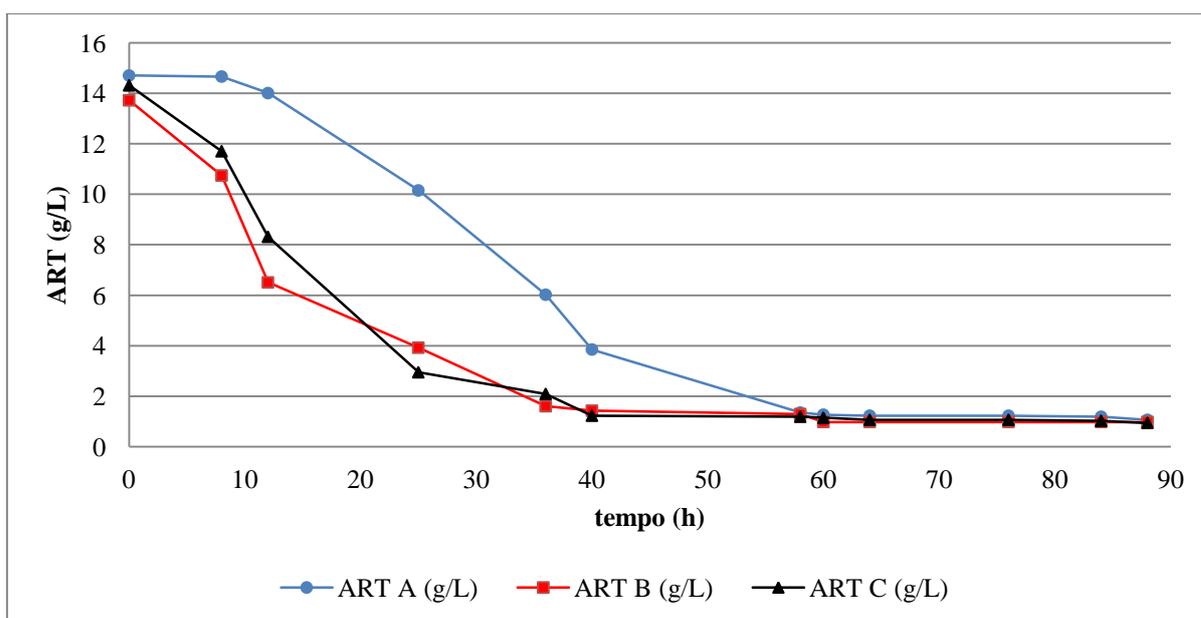


Figura 36 - Açúcares Redutores Totais em função do tempo para as fermentações realizadas em reator Bioflo III

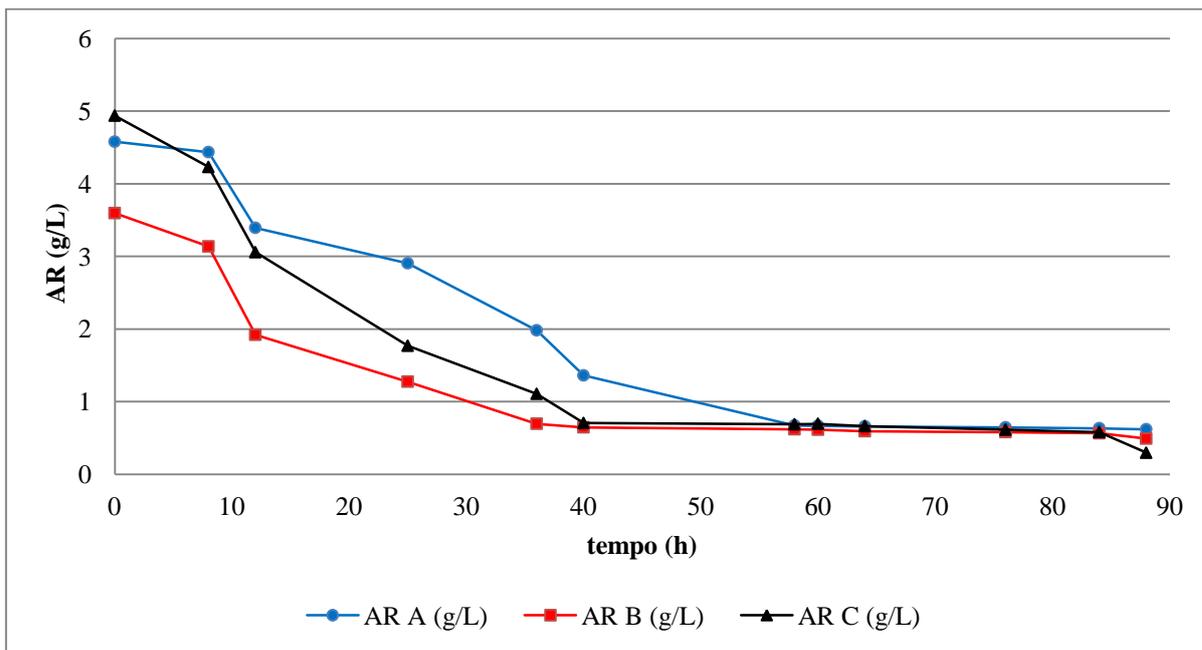


Figura 37 - Açúcares Redutores em função do tempo para as fermentações realizadas em reator Bioflo III

A Figura 38 apresenta os resultados referentes às concentrações celulares, para este ensaio, onde se obteve um valor máximo de aproximadamente 11 g/L em 36 h de cultivo.

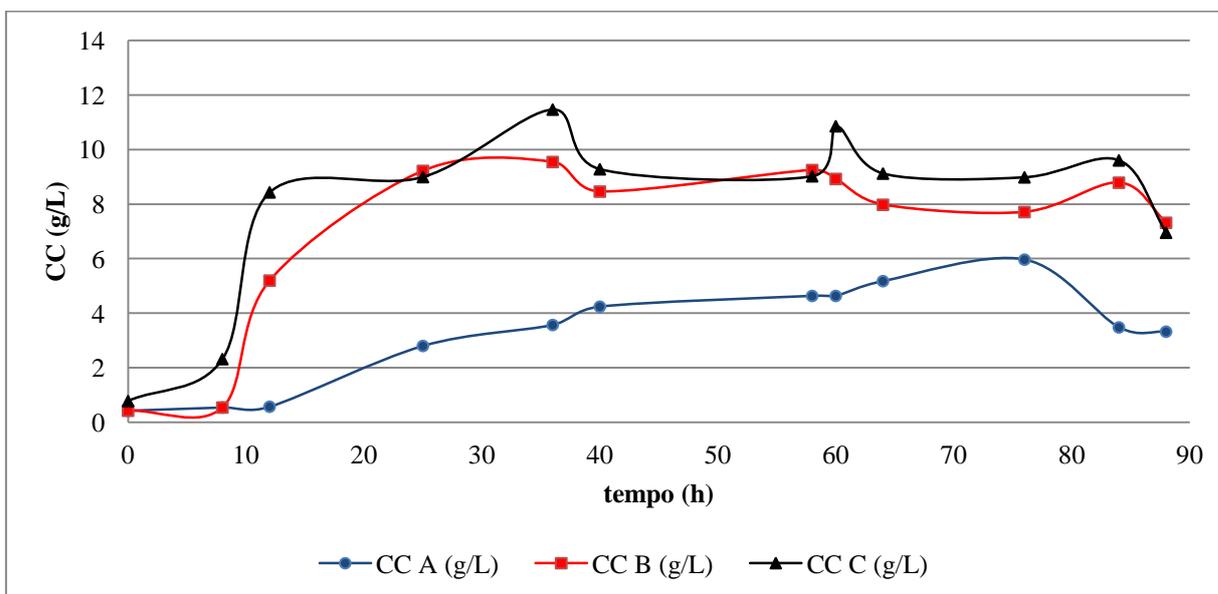


Figura 38 - Concentração Celular em função do tempo para fermentações realizadas em reator Bioflo III

A Figura 39, ilustra os perfis de pH, mostrando novamente que o tampão carbonato é bastante eficiente para estes períodos de fermentação, mantendo o meio acima de 8,5.

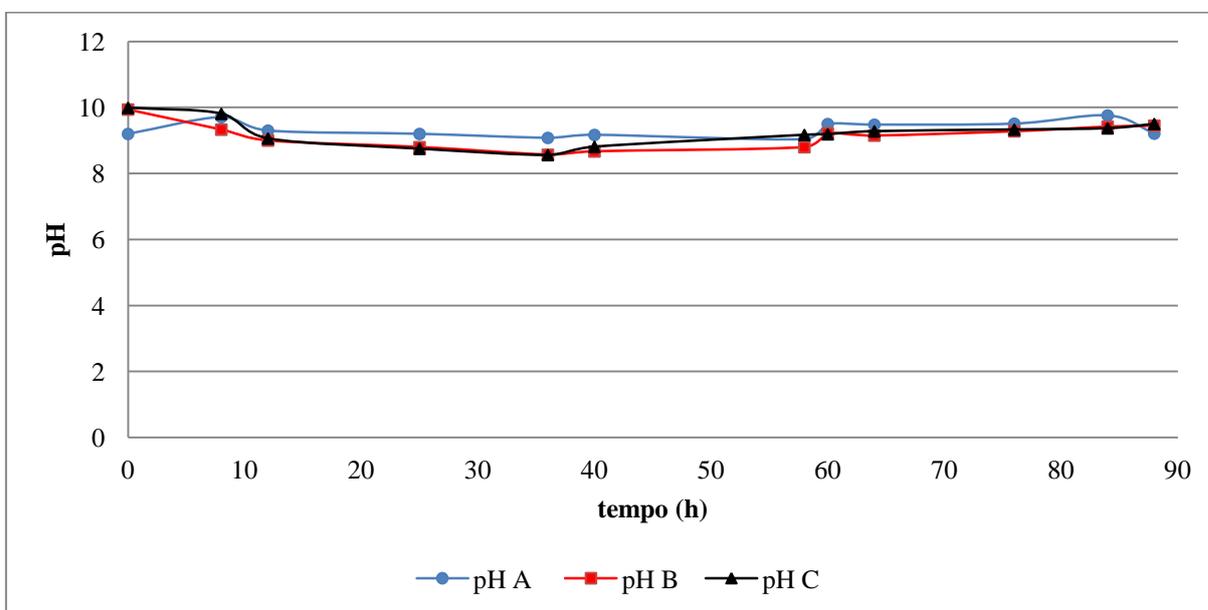


Figura 39 - pH para fermentação realizada em Bioflo III

As proteínas solúveis apresentada na Figura 40, atingiram aproximadamente 0,13 g/L em 58 h de cultivo para o ensaio A, período de maior crescimento celular observado na Figura 38, a partir de então iniciou-se uma queda até o final da fermentação (88 h) . Para o ensaio B observa-se valores estáveis após 8 h de cultivo mantendo-se na faixa de 0,11 g/L com queda também após 58 h. Com relação ao ensaio C, as proteínas solúveis mantiveram com valores abaixo dos ensaios A e B, chegando a valores máximos de aproximadamente 0,06 g/L mantendo-se aproximadamente estável durante todo cultivo.

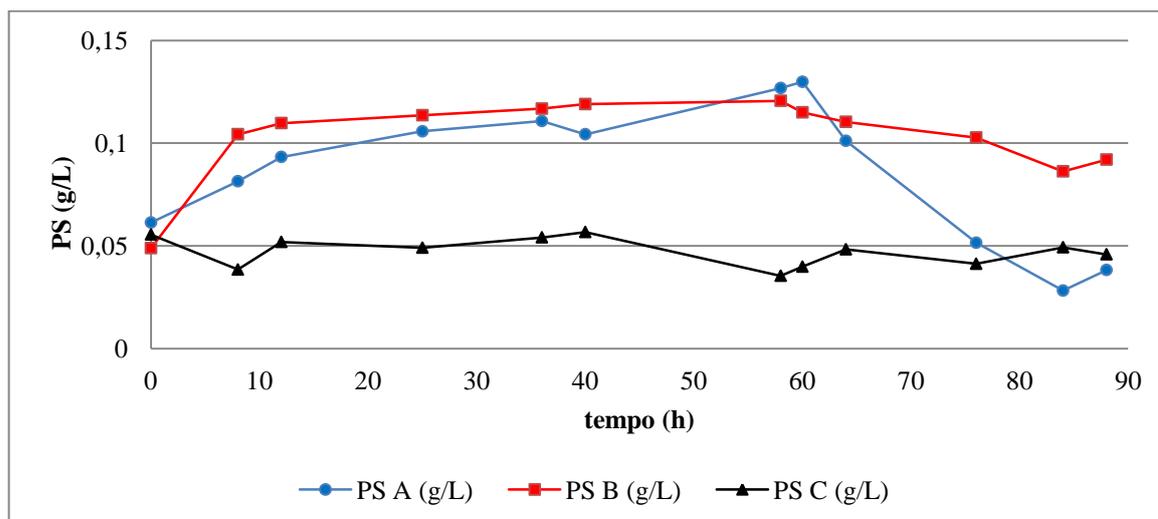


Figura 40 - Proteínas Solúveis em função do tempo para fermentações realizadas em reator Bioflo III

Com relação à Atividade Enzimática de β -CD (Figura 41), novamente os valores obtidos foram maiores que com relação γ -CD, quase dobrando seus valores, porém ainda baixos quando comparados aos valores dos autores já citados. Neste estudo, obteve-se aproximadamente 0,07 U/mL para o ensaio A, em três momentos distintos (40, 60 e 90 h) enquanto que para γ -CD (Figura 42), o valor máximo foi de 0,03 U/mL em 76 h de cultivo.

Para o ensaio B os valores máximos foram em torno de 0,03 U/mL para β -CD), porém mantiveram-se aproximadamente estáveis durante todo cultivo. Com relação γ -CD (Figura 42) o valor máximo foi de 0,013 U/mL em 64 h de cultivo.

Para o ensaio C os valores foram residuais durante todo o cultivo com valores próximos a 0,003 U/mL com relação a β -CD e com relação a γ -CD os valores foram em torno de 0,001 U/mL, tendo um pequeno aumento para 0,003 a partir das 84 h de fermentação conforme pode ser verificado na Figura 42.

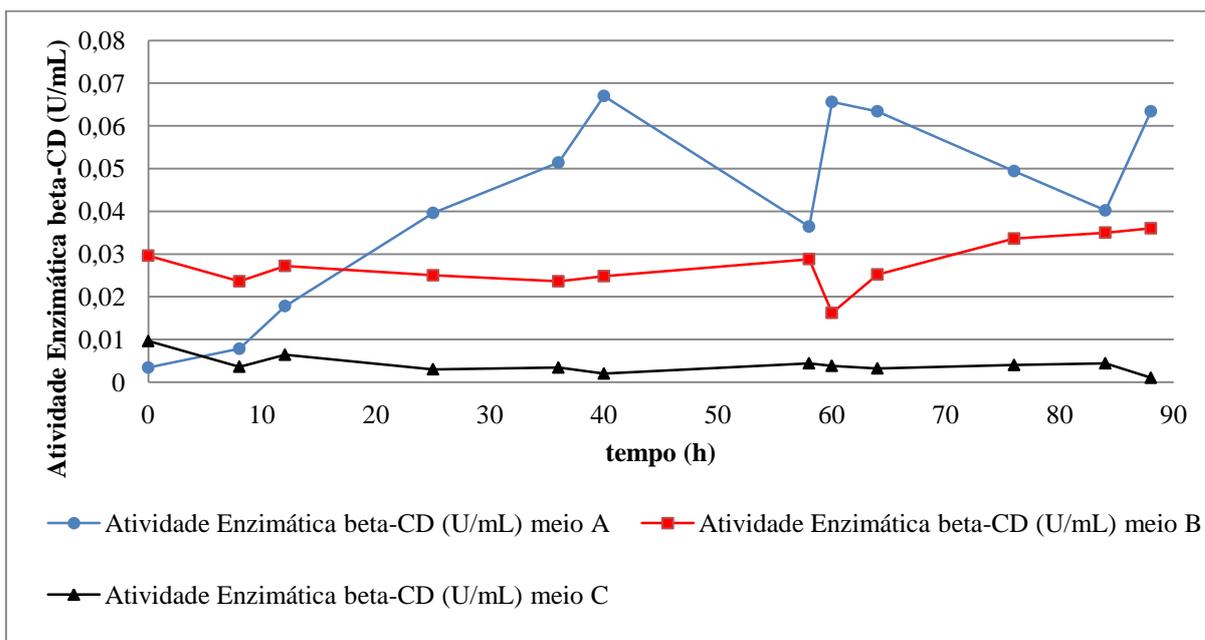


Figura 41 - Atividade Enzimática de β -CD em função do tempo para fermentações realizadas reator em Bioflo III

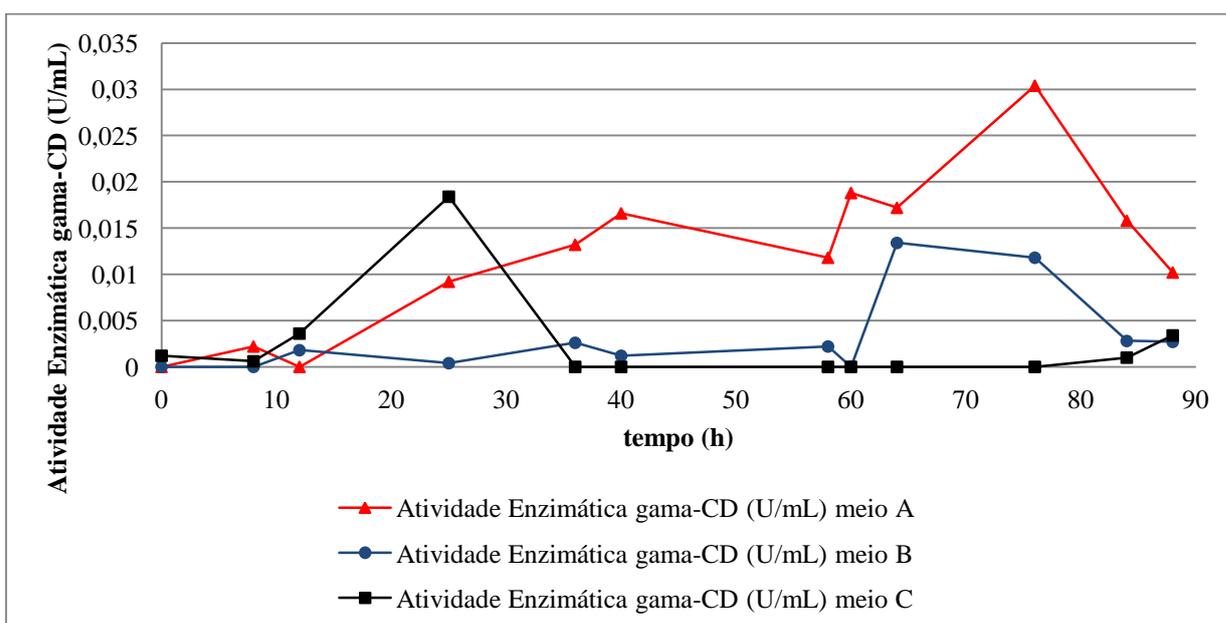


Figura 42 - Atividade Enzimática de γ -CD em função do tempo para fermentações realizadas em Bioflo III

Deve-se ressaltar que embora tenham sido menos expressivos os valores de Atividade Enzimática para γ -CD, quando comparados aos valores de β -CD, observa-se que houve produção da enzima durante toda a fermentação.

As Figuras 43 e 44, apresentam os valores referentes às Atividades Enzimáticas Específicas para β -CD e γ -CD respectivamente. Como a Atividade específica é

dada pela relação com as proteínas solúveis, observa-se que os melhores valores, ocorrem justamente durante os períodos de maior queda das proteínas solúveis.

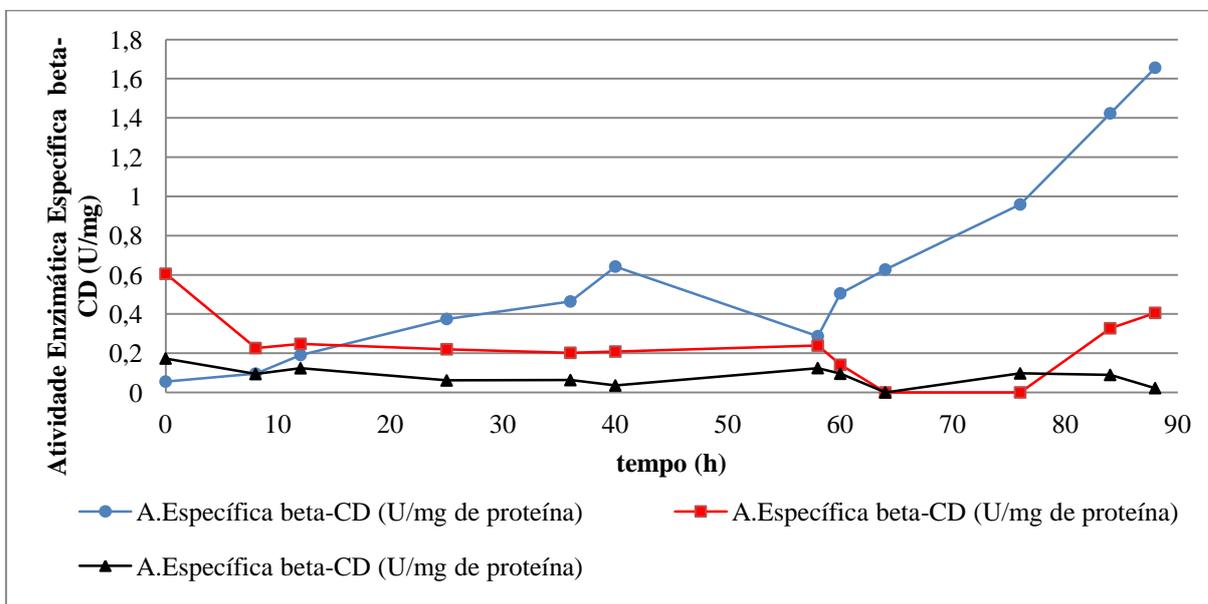


Figura 43 - Atividade Enzimática Específica de β -CD em função do tempo para fermentação realizada em reator Bioflo III

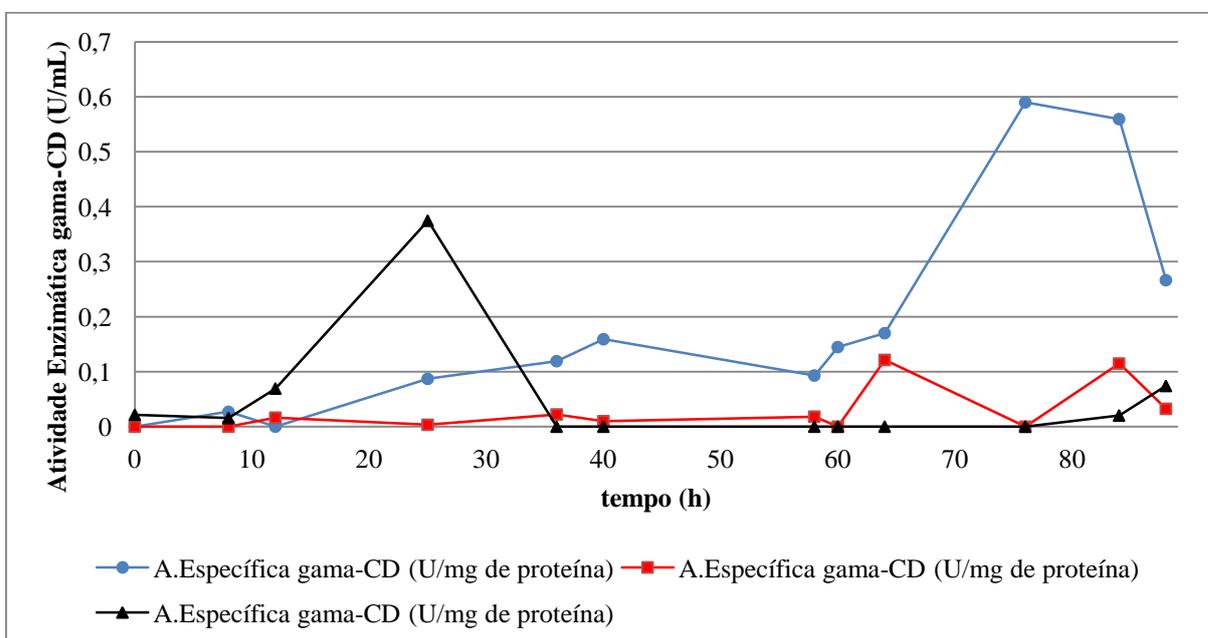


Figura 44 - Atividade Enzimática Específica de γ -CD em função do tempo para fermentação realizada em Bioflo III

Embora os três ensaios tenham sido realizados nas mesmas condições, pode-se observar que os perfis de produção da enzima CGTase, bem como o crescimento celular e produção de proteínas solúveis foram diferentes. Este fato pode ter ocorrido devido o inoculo

utilizado. O inóculo utilizado no meio A seguiu todo procedimento para obtenção já citado no item 3.2 subitem 3.2.1. Para os ensaios B e C, utilizou-se o mesmo inóculo, porém o mesmo foi conservado em refrigerador, este fato pode ter ocasionado divergências nos resultados já citados acima.

4.5 Ensaio 5

Nos ensaios que serão apresentados a partir deste ensaio (5), utilizou-se uma CEPA que estava em condições diferentes de armazenamento e menos tempo de armazenagem, mantida a temperatura ambiente e não em refrigerador.

O meio padrão utilizado foi o de Horikoshi modificado, reduzindo a concentração de extrato de levedura para 1%, a concentração de amido foi mantida em 2,5% utilizando amido de milho comercial (Marca Bom Preço).

A Figura 45, apresenta o comportamento do crescimento celular, os perfis de concentrações de Açúcares Redutores e Açúcares redutores Totais, bem como a variação do pH ao longo da fermentação.

Pode-se observar dois momentos mais expressivos com relação ao crescimento celular atingindo valores máximos de aproximadamente 1,8 e 1,4 g/L em 32 e 103 h respectivamente. Quando se compara esses valores com os resultados anteriores verifica-se que a CEPA nova utilizada apresentou características diferentes, com menor crescimento celular. O pH manteve-se estável próximo a 10, a concentração de açúcares redutores manteve-se baixa chegando a 0,72 g/L após 70 h de fermentação até o final do cultivo.

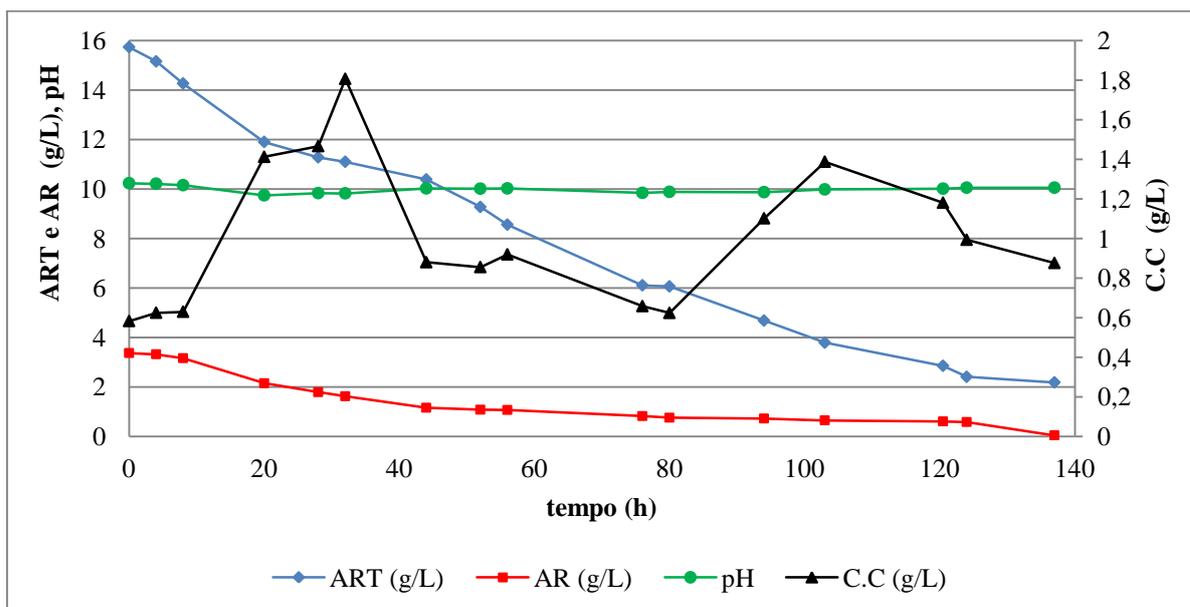


Figura 45 - AR, ART, pH e CC em função do tempo para fermentação realizada em reator Bioflo III

A Figura 46 apresenta os resultados para Proteínas Solúveis e Atividade Enzimática para β e γ -CD em função do tempo. Os valores obtidos mesmo sendo baixos, mostram atividade ao longo de todo o cultivo. Onde para β -CD os valores máximos foram próximos de 0,07 U/mL em 103 e 137 h, e para γ -CD o valor máximo foi de 0,03 em 103 h de cultivo.

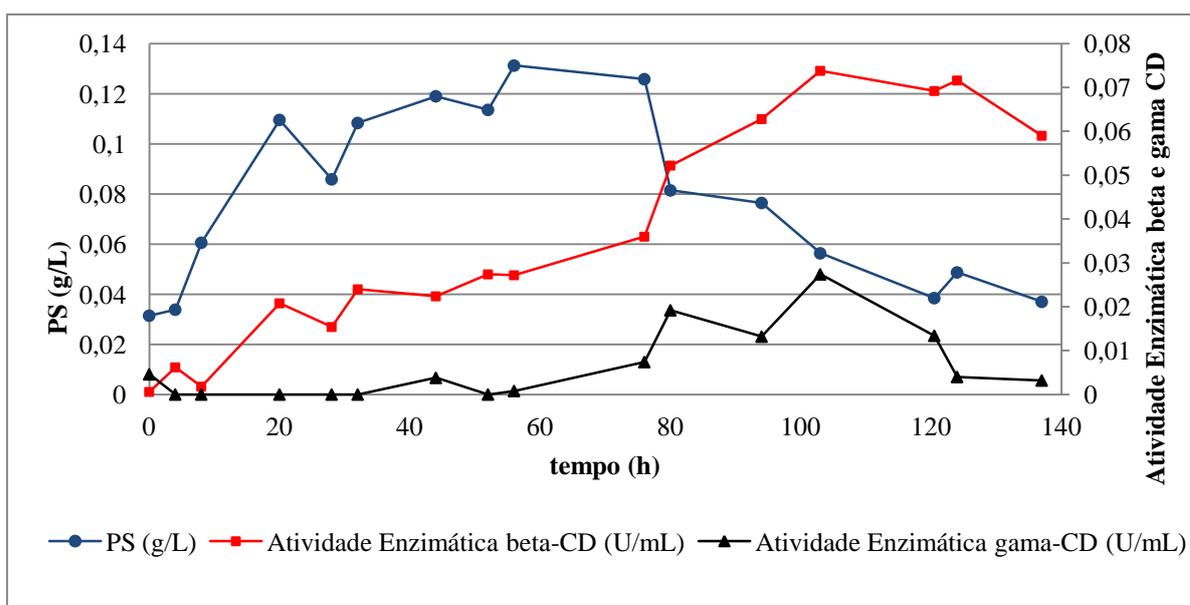


Figura 46 - PS, Atividade Enzimática em função do tempo para fermentação realizada reator em Bioflo III

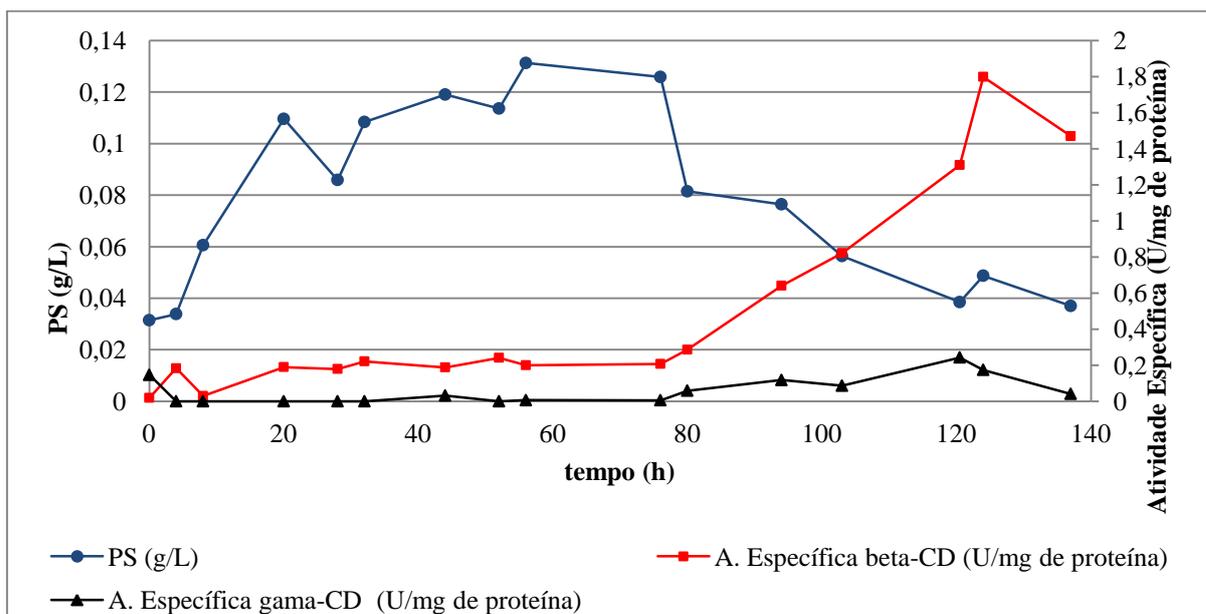


Figura 47 - PS, Atividade Enzimática Específica em função do tempo para fermentação realizada no reator em Bioflo III

Pode-se verificar pela Figura 47, um comportamento estável na atividade enzimática específica até aproximadamente 80 h, os melhores resultados para síntese da CGTase neste ensaio ocorrem a partir das 80 h (aproximadamente quando houve um novo momento de crescimento celular como já observado na Figura 45, diferente dos ensaios anteriores onde os melhores resultados encontravam-se geralmente nos tempos iniciais de cultivo.

Atividade específica torna-se também mais representativa após 80 h, observa-se que os melhores valores, ocorrem justamente durante os períodos de maior queda das proteínas solúveis conforme mostrado nas Figuras 46 e 47.

4.6 Ensaio 6

Para o Ensaio 5, foi utilizado amido de milho comercial (Bom Preço), para fins de comparação este Ensaio 6, utilizou-se amido solúvel. Mantendo o meio padrão utilizado de Horikoshi modificado, reduzindo a concentração de extrato de levedura para 1 %, e a concentração de amido mantida em 2,5 %.

Os resultados apresentados na Figura 48, para crescimento celular são pouco melhores em comparação com o resultado anterior (1,8 e 1,4 g/L), aqui observa-se valores próximos 2,3 g/L em 30 h com posterior queda e um novo aumento após 50 h, chegando 1,68 g/L em 78 h e 1,72 g/L em 120 h de cultivo. Observa-se também, que os valores de pH se mantiveram bastantes estáveis com valores próximos a 10.

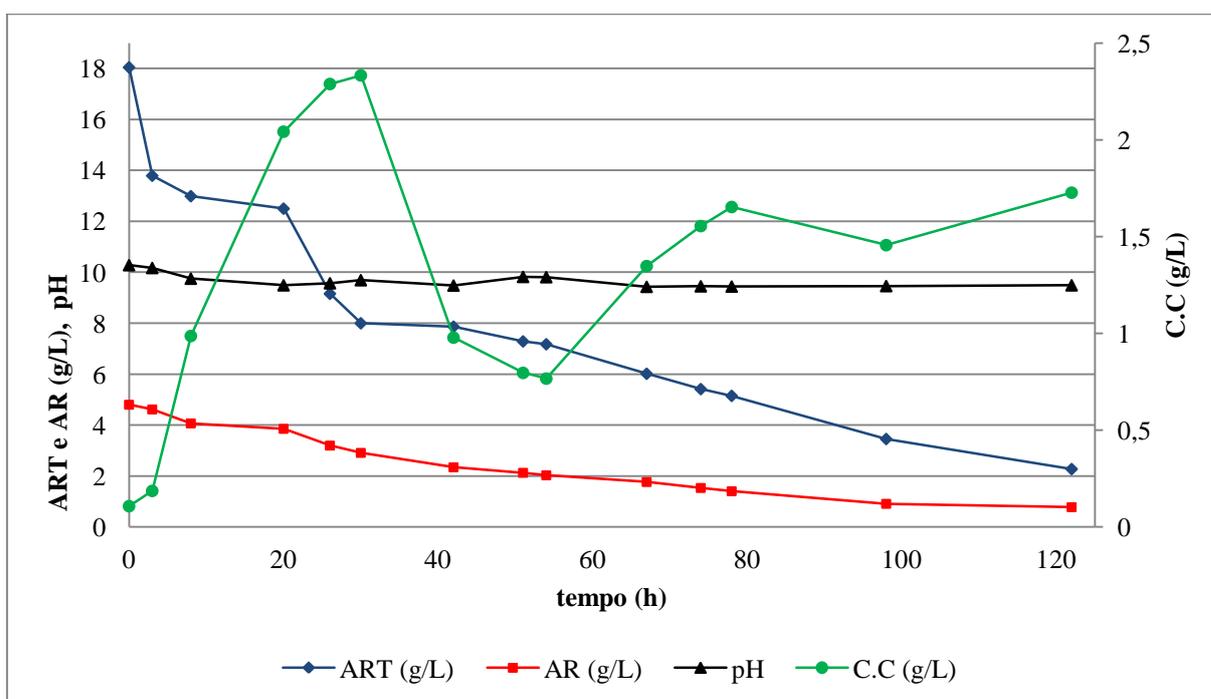


Figura 48 - Concentrações de AR, ART, pH e CC em função do tempo para fermentação realizada em reator Bioflo III

Com relação à Atividade Enzimática (Figura 49), os resultados obtidos foram praticamente crescentes durante todo cultivo para β -CD, chegando 0,03 U/mL em 26 h, com posterior queda, iniciando aumento novamente em 30 h, chegando a 0,07 U/mL em 120 h de cultivo. Novamente os valores para γ -CD foram mais baixos, atingindo 0,04 U/mL em 74 h, fato que também pode ser verificado.

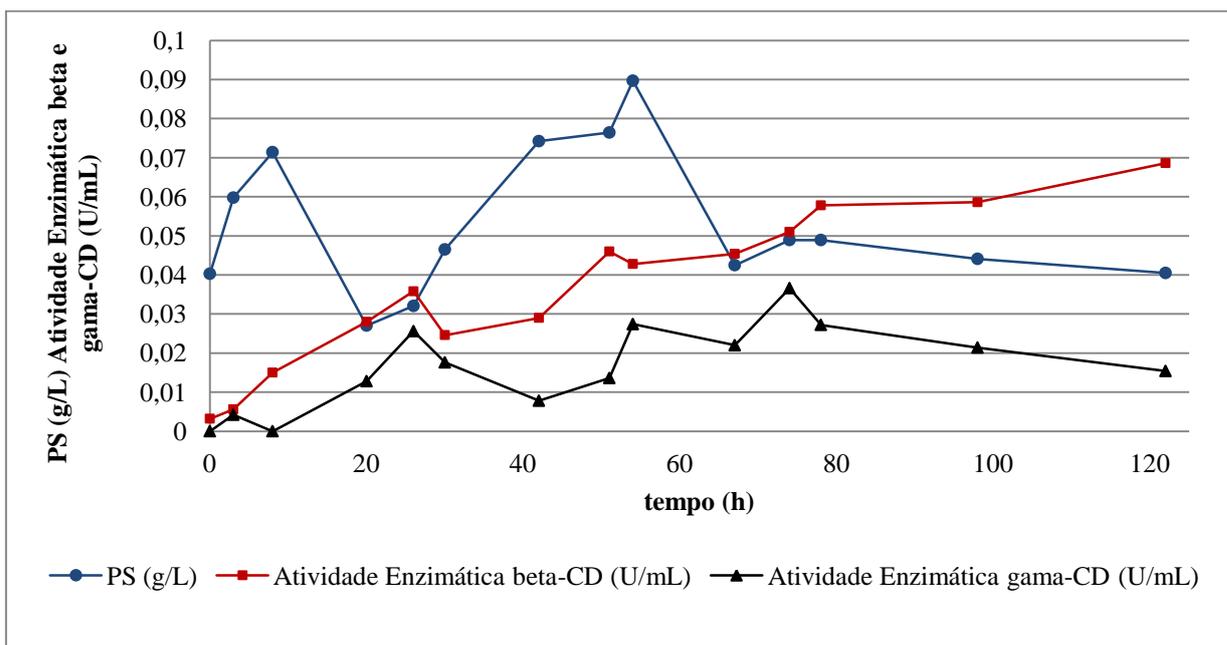


Figura 49 - PS e Atividade Enzimática em função do tempo para fermentação realizada em reator Bioflo III

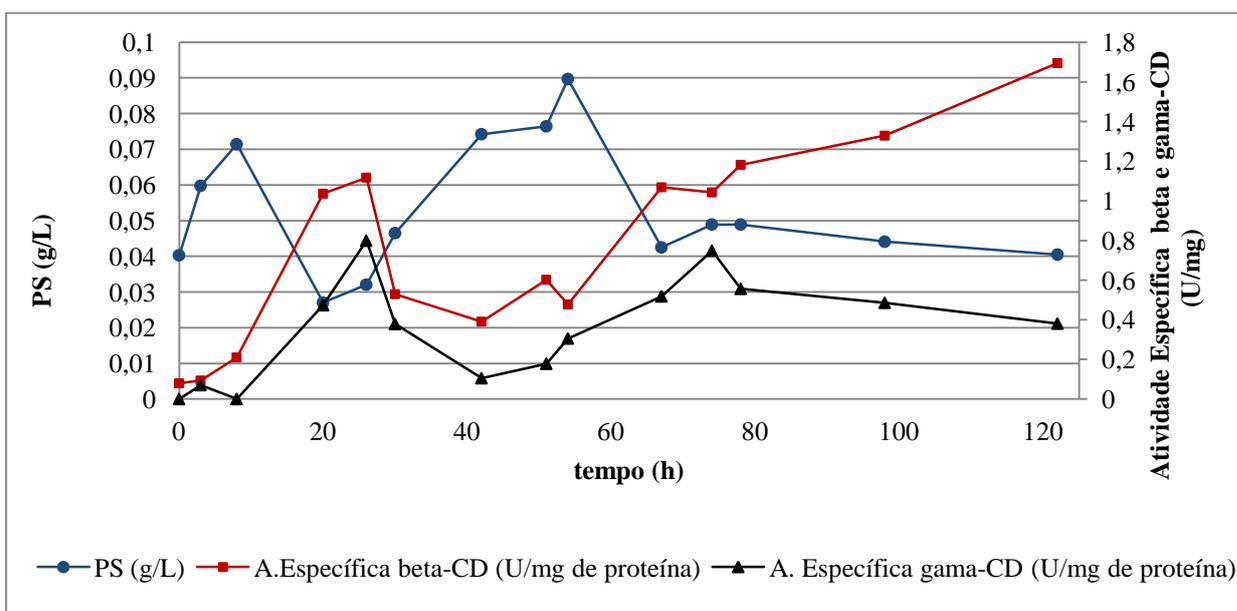


Figura 50 - PS e Atividade Enzimática Específica em função do tempo para fermentação realizada em reator Bioflo III

Novamente se observa pela Figura 50 que os melhores valores para Atividade específica, ocorrem durante os períodos decaimento das proteínas solúveis, neste ensaio também se observou uma grande variação nos teores de proteínas durante o cultivo, mas que não seguiram a mesma tendência do crescimento celular apresentado na Figura 48.

4.7 Ensaio 7

O meio padrão utilizado para este ensaio foi o de Horikoshi modificado, reduzindo a concentração de extrato de levedura para 1%, a concentração de amido foi mantida em 2,5 % utilizando amido de milho comercial. Foram dados pulsos de meio padrão concentrado (dobro dos reagentes) em 97, 209 e 259 horas, com o intuito de verificar o comportamento do micro-organismo com relação ao crescimento celular e produção de enzimas. Os volumes aplicados ao fermentador durante os pulsos eram equivalentes aos volumes retirados de amostras até aquele instante, com o intuito de manter o volume original no meio de cultivo do início da fermentação.

A Figura 51 ilustra o perfil da concentração de Açúcares Redutores e Açúcares Redutores Totais em função do tempo. As setas indicam os pulsos aplicados.

Nota-se através da Figura 52, que após a aplicação dos pulsos há recuperação do crescimento celular, pois os pulsos foram aplicados em momentos que os açúcares redutores estavam baixos (aproximadamente 0,8 g/L).

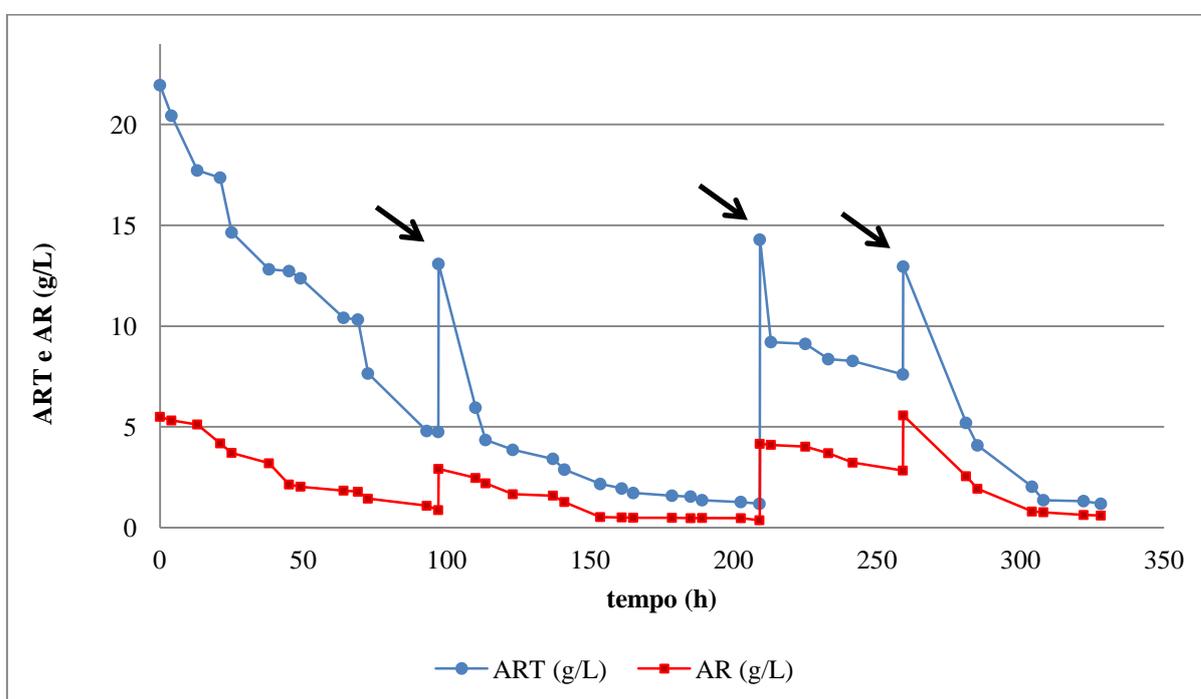


Figura 51 - ART e AR em função do tempo, com pulsos de alimentação para fermentação realizada em reator Bioflo III

A Figura 52, representa as variações de pH e crescimento celular em função do tempo, onde obteve-se novamente valores mais expressivos para crescimento celular,

atingindo valores de 3,81 g/L antes do primeiro pulso, as quedas mais bruscas nos valores de concentração celular ocorrem devido a diluição do meio de cultura, quando adicionados os pulsos, verifica-se uma recuperação rápida no crescimento celular após o primeiro pulso, atingindo 5,5 g/L em 202 h de cultivo e também após o terceiro pulso chegando a aproximadamente 6,23 em 322 h de cultivo indicando boa atividade metabólica do micro-organismo. O pH manteve-se estável com pequenas variações após aplicação dos pulsos, devido reposição do tampão carbonato.

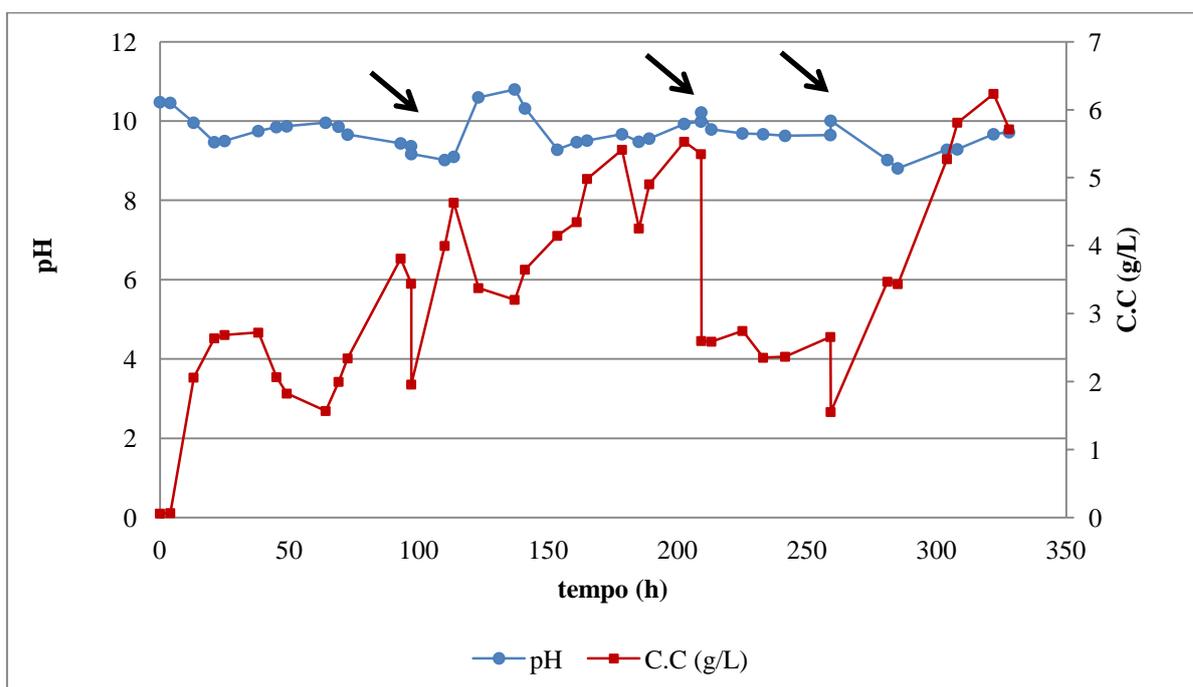


Figura 52 - Concentração Celular e pH em função do tempo, com pulsos de alimentação para fermentação realizada em reator Bioflo III

Com relação às Atividades Enzimáticas (Figura 53), obteve-se um valor representativo com relação a γ -CD (0,26 U/mL em 165 h de fermentação), este fato também foi observado no ensaio 2, onde utilizando pulsos de amido a atividade de γ -CD foi em torno de 0,11 U/mL em 59 e 200 h de fermentação. Apresentando perfis similares, enquanto que para β -CD os valores foram baixos mantendo-se na faixa de aproximadamente 0,004 U/mL durante quase todo tempo de cultivo.

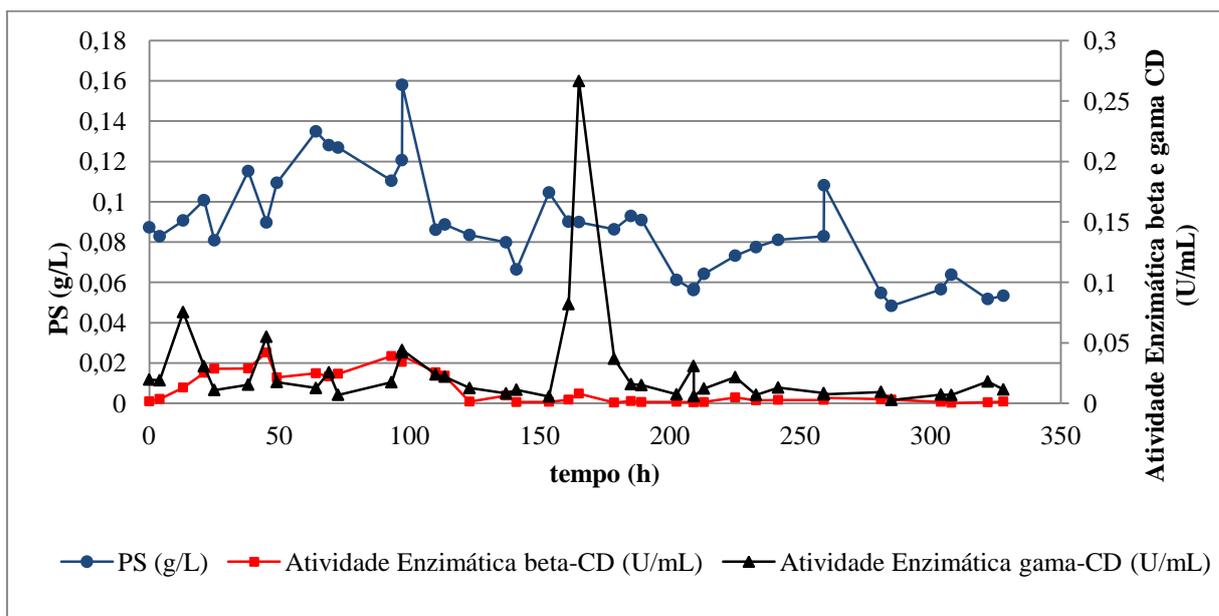


Figura 53 - PS e Atividade Enzimática em função do tempo, com pulsos de alimentação para fermentação realizada em reator Bioflo III

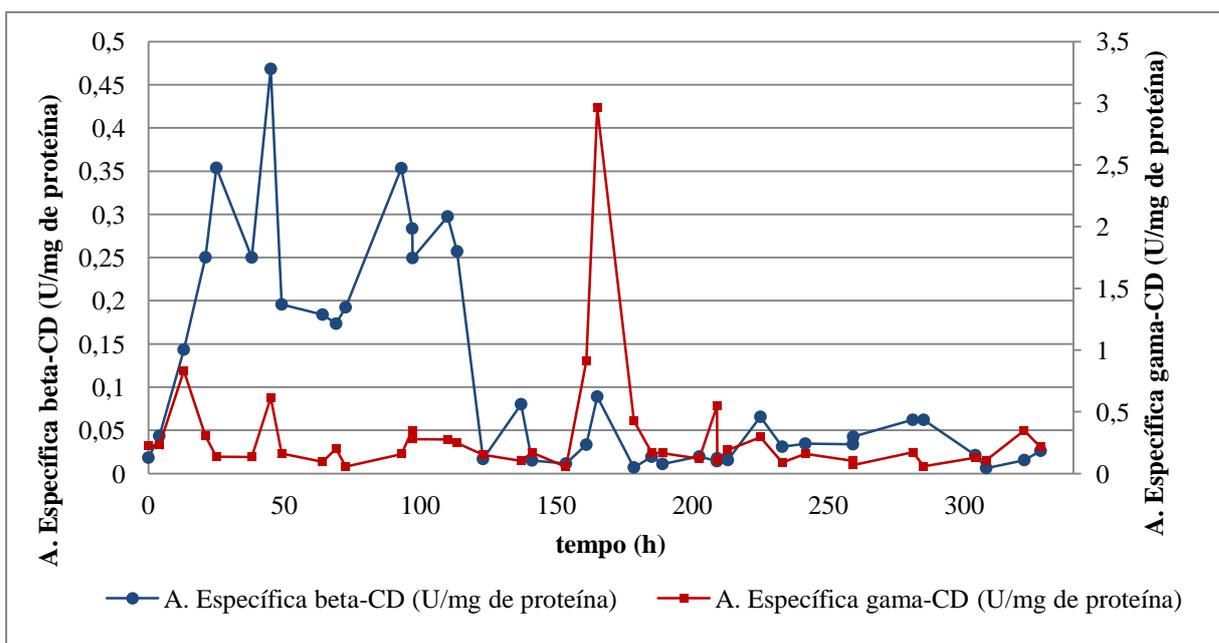


Figura 54 - PS e Atividade Enzimática Específica em função do tempo, com pulsos de alimentação para fermentação realizada em reator Bioflo III

Com relação a β -CD os valores máximos obtidos foram de 0,023 U/mL em 50 e 100 horas respectivamente, mantendo-se praticamente residual após 123 horas de fermentação. Talvez este fato seja um indicativo de que em processos onde são aplicados pulsos de amido, ocorre favorecimento na síntese da enzima γ -CGTase, já que sabe-se que

em condições normais de cultivo, o *Bacillus firmus* produz preferencialmente a enzima β -CGTase.

4.8 Ensaio 8

Para o ensaio 8, o meio padrão utilizado foi o de Horikoshi modificado, a concentração de extrato de levedura reduzida para 1%, e a concentração de amido foi mantida em 2,5% utilizando amido comercial. O meio de cultivo foi alimentado com o meio concentrado conforme Tabela 7 em 56, 100, 128, 163, 200, 225, 266 e 342 horas.

Tabela 7 - Meio concentrado utilizado na realimentação

Componentes (% p/v)	Meio de Cultivo
Amido de milho	5,0
Peptona	2,0
Extrato de Levedura	2,0
MgSO ₄	0,04
K ₂ HPO ₄	0,2
Na ₂ CO ₃	2,0
α -Amilase	0,050

A Figura 55, representa as variações de concentrações de açúcares e células ao longo do cultivo. As setas indicam os momentos onde houve reposição do meio de cultivo com meio concentrado conforme mostrado na Tabela 7. Pode ser observado na Figura 55 que após a primeira reposição do meio (56 horas), houve uma resposta rápida no crescimento celular, que havia apresentado uma queda gradativa após 44 horas de cultivo, este fato se repetiu após todas as reposições do meio de cultura, chegando a um valor máximo para o crescimento celular de aproximadamente 5,3 g/L em 390 horas.

Após 63 horas de cultivo não houve grandes variações na concentração dos açúcares mesmo após as reposições, assim o ART se manteve na faixa de 4 a 2 g/L e o AR na faixa de 1 g/L. As reposições foram feitas considerando os volumes de amostras retirados do fermentador para as análises, no intuito de manter o volume inicial aproximadamente constante bem como os nutrientes necessários para o bom desenvolvimento celular. Assim

por exemplo, após 56 horas de cultivo haviam sido retirados um total de 160 mL de meio, logo foram repostos 160 mL com meio novo, após as 56 horas até 100 horas foram retirados 80 mL, assim em 100 horas foi feita reposição de 100 mL, e assim sucessivamente até o final do cultivo perfazendo um total de 409 horas sendo a última reposição em 342 horas, sempre inserido somente aquilo que havia sido retirado.

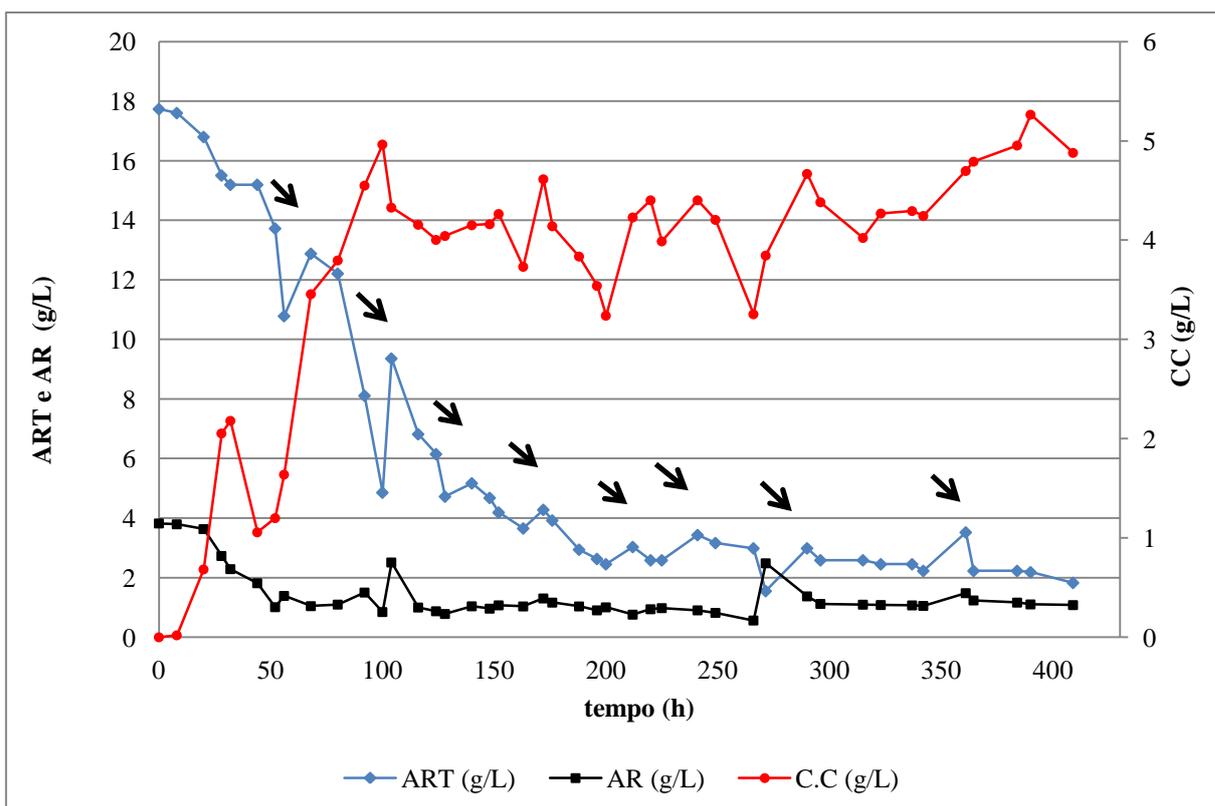


Figura 55 - Concentrações de ART, AR e CC em função do tempo, para fermentação com realimentação realizada em reator Bioflo III

A Figura 56, apresenta as variações de pH e concentração celular em função do tempo, como pode ser observado, não houve variação significativa do pH mantendo-se estável após 28 horas de cultivo na faixa de 9 a 9,7.

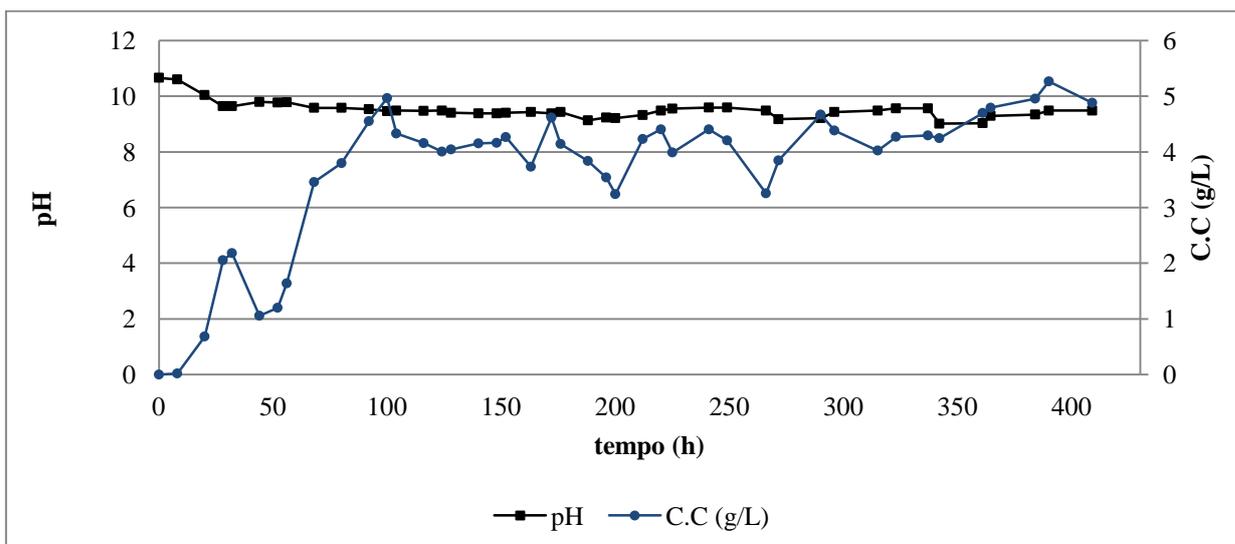


Figura 56 - Concentração Celular e pH em função do tempo para fermentação com realimentação realizada reator em Bioflo III

Com relação à concentração de proteínas solúveis conforme Figura 57, observa-se um aumento gradativo após as 44 horas de cultivo chegando a valores de aproximadamente 0,18 g/L em 220, 315 e 409 horas de cultivo.

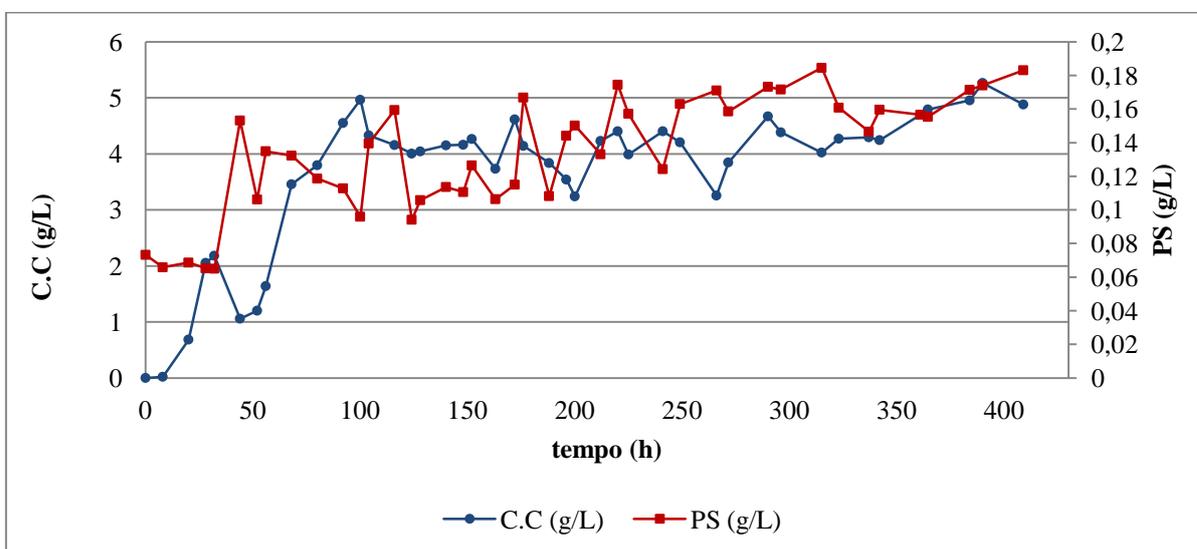


Figura 57 - Concentração Celular e concentração de Proteínas Solúveis em função do tempo, para fermentação com realimentação realizada em reator Bioflo III

As Figuras 58 e 59 apresentam os valores de Atividade enzimática e Atividade Enzimática Específica para β e γ -CD, os valores mais representativos se encontram nas primeiras 70 horas, onde também ocorreu o período de maior crescimento celular, pode ser observado que houve uma atividade significativa para γ -CD, chegando a 0,15 U/mL em 68

horas, onde também ocorreu o melhor resultado para β -CD, porém com valores bem abaixo quando comparados, sendo aproximadamente 0,05 U/mL no mesmo intervalo de 68 horas.

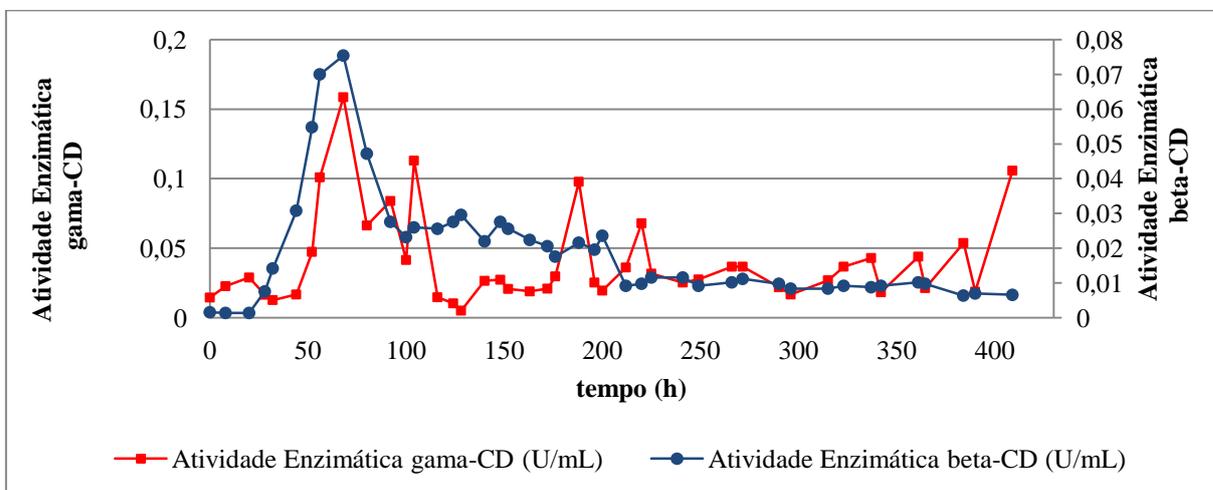


Figura 58 - Atividade Enzimática em função do tempo para fermentação com realimentação realizada em reator Bioflo III

Segundo a Figura 58, ainda pode-se verificar 4 momentos onde houve melhor produção de γ -CD, em 68,104,188 e 409 horas de cultivo chegando a 0,15; 0,11; 0,10 e 0,11 U/mL respectivamente.

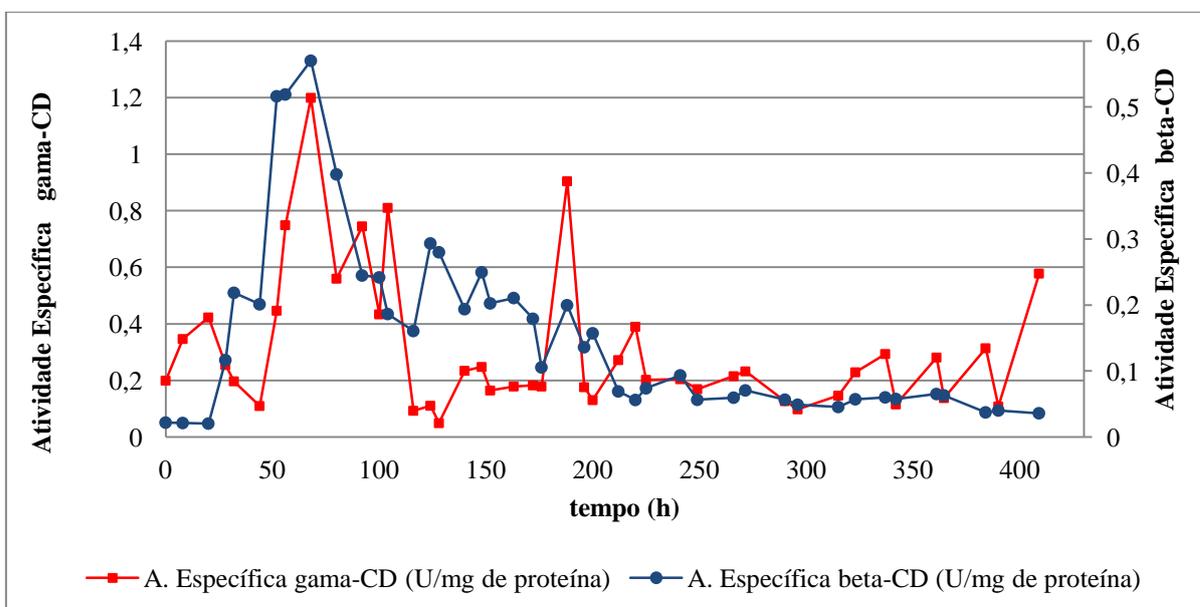


Figura 59 - Atividade Enzimática Específica em função do tempo para fermentação com realimentação realizada reator em Bioflo III

Com relação à atividade enzimática e atividade enzimática específica, observados tanto na Figura 58 quanto na Figura 59, nota-se que houve grande oscilação quanto a concentração de γ -CD em função do tempo de fermentação, diferentemente dos comportamentos referentes as atividades para β -CD que apresentou um ponto de máximo em torno de 68 horas de cultivo com posterior redução de atividade até o final do cultivo.

4.9 Ensaio 9

Para o ensaio 9, o meio padrão utilizado foi o de Horikoshi modificado, a concentração de extrato de levedura reduzida para 1%, e a concentração de amido foi mantida em 2,5% utilizando amido de milho comercial. O meio de cultivo foi alimentado com o meio concentrado conforme Tabela 7, já apresentada anteriormente no item 4.8, em 80, 124, 172, 220 e 316 horas.

A Figura 60 representa as variações de concentrações de açúcares e células ao longo do cultivo. As setas indicam os momentos onde houve reposição do meio de cultivo com meio concentrado conforme mostrado na Tabela 7 (Item 4.8).

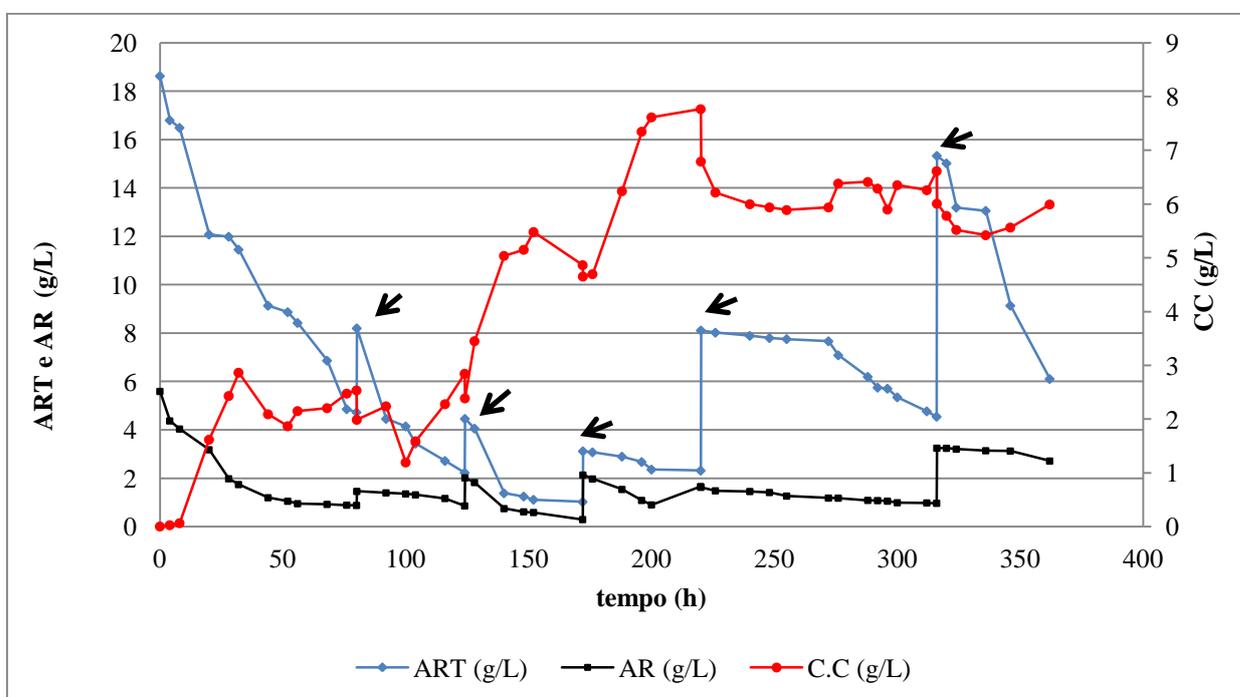


Figura 60 - Concentração de AR, ART e CC em função do tempo para fermentação com realimentação realizada em reator Bioflo III

Pode ser observado na Figura 60 que após a segunda reposição do meio (124 horas), houve uma resposta positiva quanto ao crescimento celular, que havia apresentado tendência de queda após 32 horas de cultivo, este fato se repetiu após todas as reposições do meio de cultura, chegando a um valor máximo para o crescimento celular de aproximadamente 7,8 g/L em 220 horas. As reposições foram feitas considerando os volumes de amostras retirados do fermentador para as análises, no intuito de manter o volume inicial aproximadamente constante bem como os nutrientes necessários para o bom desenvolvimento celular.

A Figura 61, apresenta as variações de pH e concentração celular, como pode ser observado, não houve variação significativa do pH mantendo se estável após 20 horas de cultivo na faixa de 9 a 9,7 com exceção de dois momentos em 92 e 148 horas que apresentaram pH 8,55 e 8,27 respectivamente.

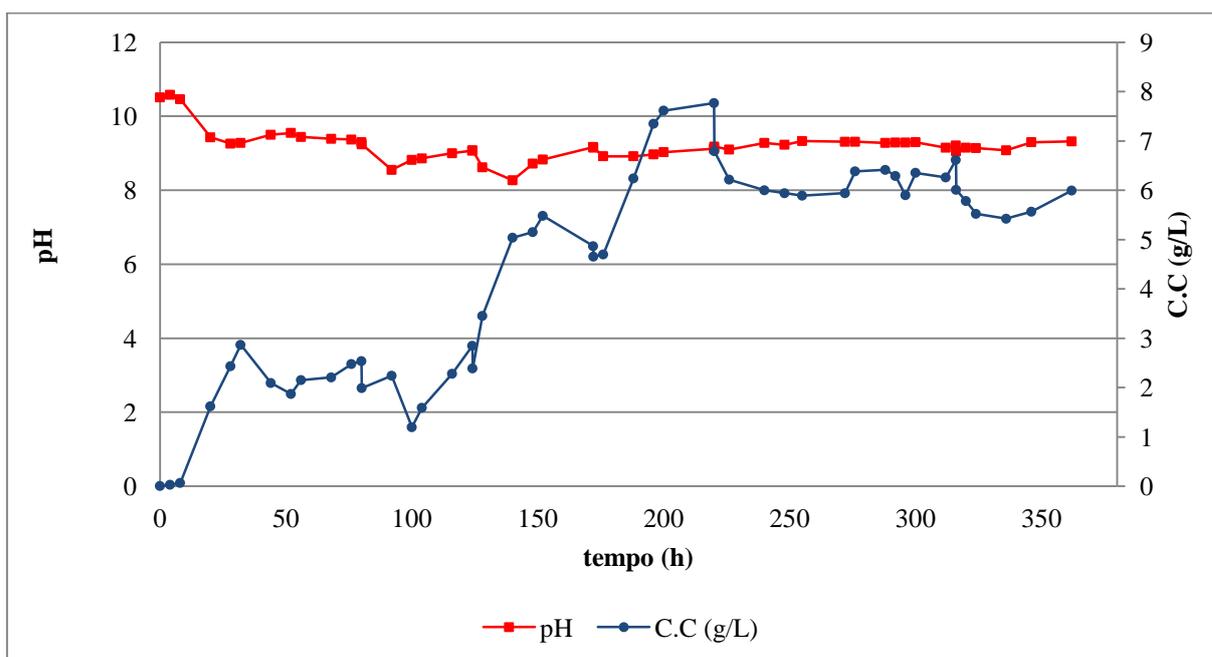


Figura 61 - Concentração Celular e pH em função do tempo para fermentação com realimentação realizada reator em Bioflo III

Com relação à concentração de proteínas solúveis conforme Figura 62, observa-se um aumento gradativo após 4 até 52 horas de cultivo chegando a valores de aproximadamente 0,18 g/L em 52 horas e 0,16 em 152 horas de cultivo, mantendo-se mais estável após 256 horas.

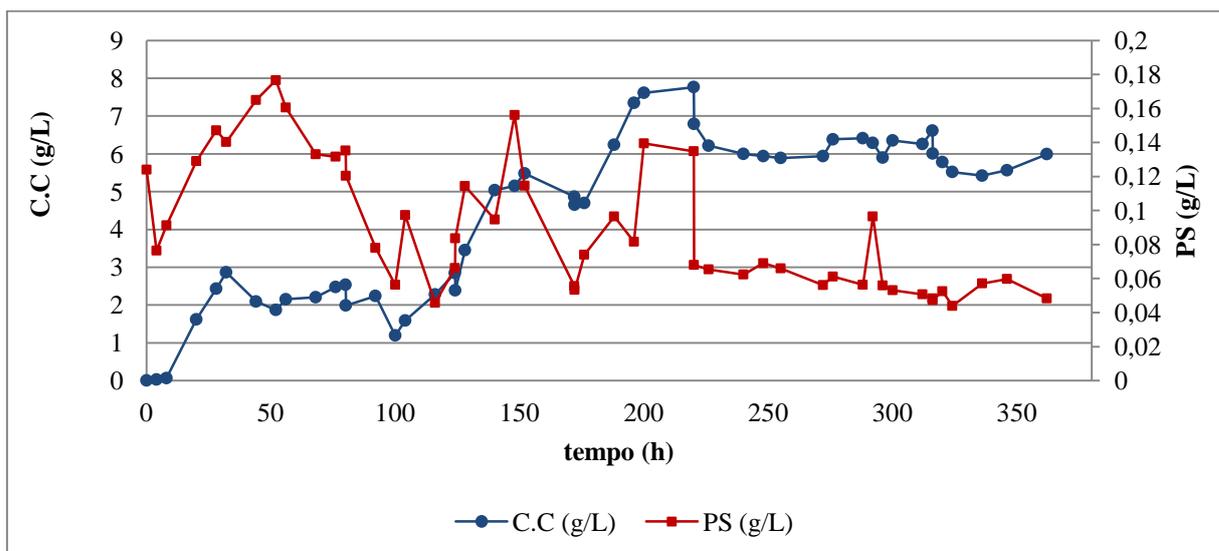


Figura 62 - Concentração celular e proteínas solúveis em função do tempo para fermentação com realimentação realizada reator em Bioflo III

As Figuras 63 e 64 apresentam os valores de Atividade Enzimática e Atividade Enzimática Específica para β e γ -CD, pode-se observar Atividade durante toda a fermentação, nota-se também que os valores obtidos foram menores quando comparados aos resultados do ensaio 7, onde obteve-se para γ -CD valores de 0,15 U/mL em 68 horas, enquanto que para este ensaio chegou-se a 0,05 U/mL em 272 horas, e com relação a produção de β -CD o melhor resultado foi de aproximadamente 0,05 U/mL em 172 horas.

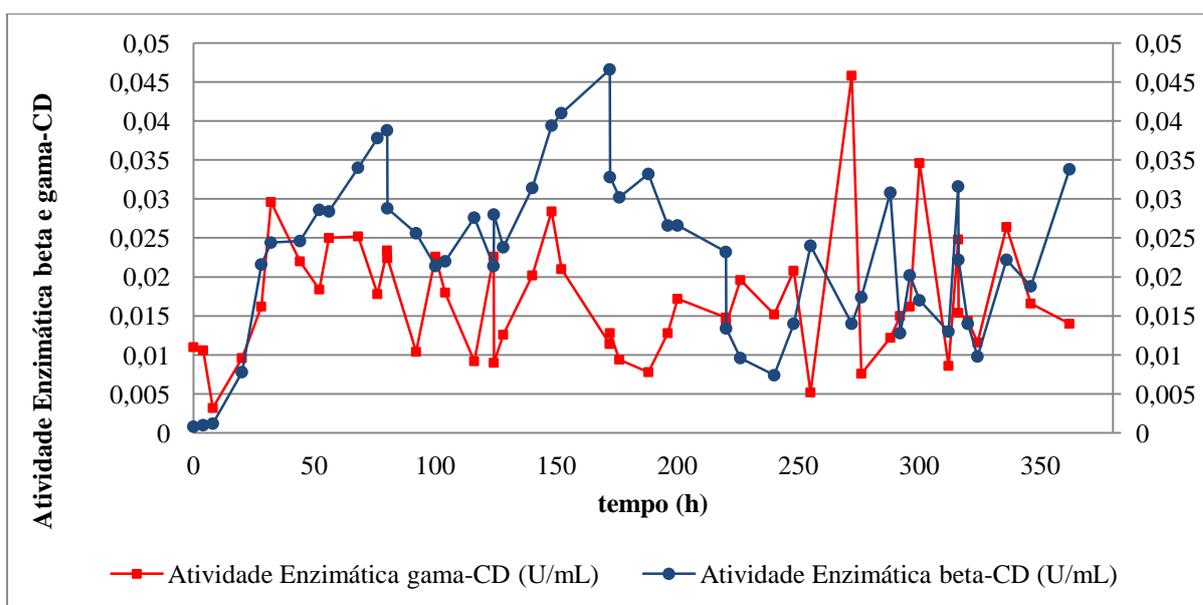


Figura 63 - Atividade Enzimática em função do tempo para fermentação com realimentação realizada reator em Bioflo III

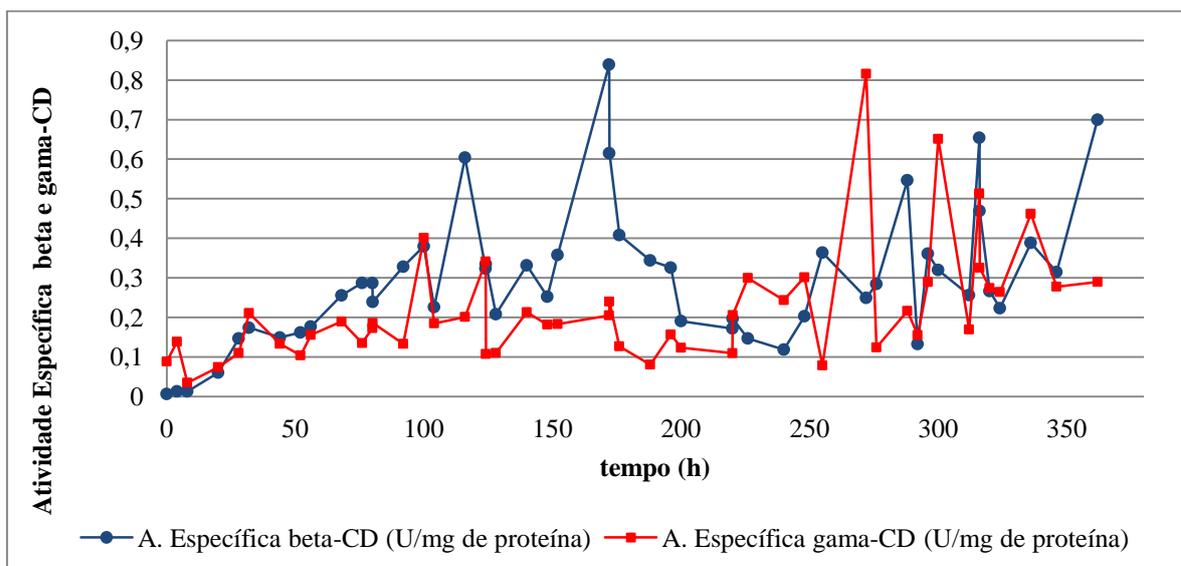


Figura 64 - Atividade Enzimática Específica para β e γ -CD em função do tempo para fermentação com realimentação realizada em reator Bioflo III

Este ensaio apresentou perfil muito diferente do ensaio 8, apresentado no item 4.8. Esperava-se que os valores fossem próximos, pois as condições de cultivo foram as mesmas, este fato dificulta uma análise comparativa quanto as atividades enzimáticas visto as inúmeras flutuações dos resultados. Este fato mostra também a dificuldade ao controlar parâmetros relacionados ao comportamento do micro-organismo, verificou-se que em todos os experimentos realizados, mesmo aqueles sob as mesmas condições os perfis de crescimento celular e síntese enzimática foram diferentes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Figura 65, compara os melhores valores obtidos no conjunto dos 9 ensaios realizados, para facilitar a interpretação devemos lembrar que:

- Primeiro ensaio realizado em agitador em *shaker*, utilizando 2,5% de amido solúvel e 2,0 % de extrato de levedura, CEPA com maior tempo de armazenamento;
- Segundo ensaio realizado em *shaker* e em biorreator (com pulso de amido), utilizando 2,5% de amido solúvel e 2,0% de extrato de levedura, CEPA com maior tempo de armazenamento, o resultado apresentado na Figura 65 refere-se aos resultados obtidos no biorreator, devido fato de serem mais expressivos em termos de Atividade enzimática;
- Terceiro ensaio realizado somente em biorreator, utilizando 2,5% de amido solúvel e 2,0% de extrato de levedura, CEPA com maior tempo de armazenamento;
- Quarto ensaio foram realizados 3 conjuntos sequencias nas mesmas condições, utilizando 2,5 % de amido solúvel e 1,0% de extrato de levedura, onde apenas o resultado mais representativo é mostrado na Figura 65;
- Quinto ensaio realizado em biorreator utilizando 2,5 de amido de milho comercial (Bom Preço) e 1,0% de extrato de levedura, CEPA com menor tempo de armazenamento;
- Sexto ensaio realizado apenas em biorreator, utilizando 2,5% amido solúvel e 1,0% de extrato de levedura, CEPA com menor tempo de armazenamento;
- Sétimo ensaio realizado em biorreator com pulsos de amido, utilizando 2,5% de amido comercial, 1,05 de extrato de levedura e CEPA com menor tempo de armazenamento;
- Oitavo ensaio realizado em biorreator com 2,5% de amido comercial, 1,0% de extrato de levedura e CEPA com menor tempo de armazenamento, sendo realimentado com meio concentrado;
- Nono ensaio realizado em biorreator com 2,5% de amido comercial, 1,0% de extrato de levedura e CEPA com menor tempo de armazenamento, sendo realimentado com meio concentrado.

Dos resultados obtidos verifica-se que a enzima CGTase produzida nos diversos ensaios conforme demonstrado na Figura 65, apresentou no ensaio sete com pulsos de amido, o melhor resultado para γ -CD e um resultado médio para β -CD.

O melhor resultado para a produção de CGTase para β -CD foi o do terceiro ensaio onde a produção de CGTase para γ -CD foi a menos efetiva de todos os ensaios. Pode-se observar assim, de uma forma não refinada, que o modo de operação teve certa influência na produção da enzima CGTase, contudo a composição do meio de cultivo utilizado também mostra a sua influência, particularmente na administração de quantidades diferentes de extrato de levedura.

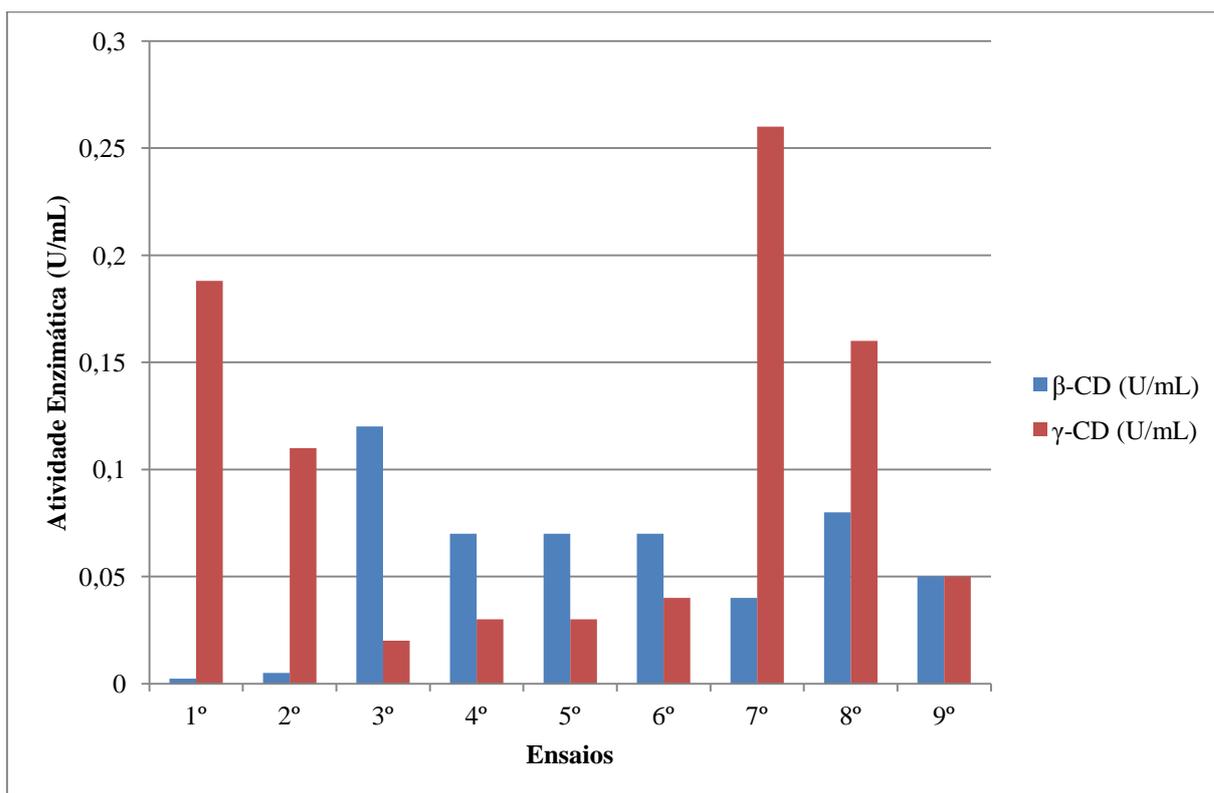


Figura 65 - Comparação entre os valores obtidos para as Atividades Enzimáticas da CGTase para produção de β e γ -CD para o conjunto de 8 ensaios realizados em diferentes condições de cultivos

O principal objetivo deste trabalho foi verificar a influência da realimentação do meio de cultivo durante a fermentação, para a obtenção de enzima CGTase. Assim foram realizados vários conjuntos de ensaios em diferentes condições, buscando encontrar os melhores resultados e o entendimento de algumas variáveis envolvidas nestes processos. Do primeiro ao sétimo ensaio foram retirados vários dados importantes com relação ao tipo de substrato utilizado para a síntese da CD pela CGTase (amido solúvel ou amido comercial), onde verificou-se que o amido comercial apresentou valores ligeiramente melhores principalmente com relação a produção de γ -CD. Seria necessário fazer uma análise mais detalhada com relação a este substrato, a fim de verificar sua real composição e

consequentemente verificar se alguns destes compostos influenciam positivamente na síntese enzimática das CDs. Outro fato importante é que foram verificados e mensurados dois tipos de enzimas envolvidas neste processo, a β e a γ -CD, uma vez que os estudos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa verificaram apenas a formação da enzima β -CD.

Com relação aos resultados obtidos por Marques (2008) de 0,84 U/mL de β -CD, Carmelo (2009) que utilizando amido solúvel e sulfato de amônio obteve 0,053 U/mL e Santos (2013) que em pH 8,3 obteve 0,22 U/mL ambas para β -CD. Assim, quando comparados os resultados obtidos no 8º ensaio, onde se realizou a realimentação em momentos diferentes, obteve-se 0,08 U/mL de β -CD e 0,16 U/mL de γ -CD, e no ensaio 9 aproximadamente 0,05 U/mL para β e γ -CD, pode-se observar efeito positivo para produção de γ -CD, embora o *Bacillus firmus* CEPA 37 tenha capacidade de produzir preferencialmente β -CD, verificou-se que nos ensaios onde foi realizada realimentação, bem como nos ensaios onde foram realizados pulsos de amido, ocorreram picos de produção de CGTase na síntese de γ -CD, isto deve ser levado em consideração visto que esta apresenta maior valor de mercado.

SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Em ensaios futuros utilizando o micro-organismo *Bacillus firmus* Cepa 37 para a síntese da enzima CGTase, alguns aspectos interessantes poderiam ser explorados, que devido à limitação de tempo neste trabalho, não foram possíveis de serem realizados.

- Verificar a ocorrência de α -CDs, juntamente com β e γ -CDs e quantificar qual a proporção na formação de cada uma delas;
- Verificar ocorrência de outras enzimas no meio de cultivo como as proteases, ciclodextrinases, glucoamilase, xylanases entre outras da família das amilases, que possam comprometer a produção das CGTases;
- Utilizar outras técnicas além da espectrofotometria, para quantificação das CDs formadas, afim de comparar os resultados e obter uma técnica mais precisa;
- Utilizar metodologias diferentes na quantificação de proteínas solúveis, atividade enzimática para fins de comparação;
- O reator BioFlo III utilizado tem capacidade máxima de 1,2 L, impossibilitando coletas mais representativas de volumes para análises. A utilização de um reator com maior capacidade seria interessante, pois permitiria duplicatas das análises necessárias ou possibilidade de análise de outras enzimas como já citado anteriormente.
- Após centrifugação das amostras retirava-se o sobrenadante para análises e a biomassa utilizada para análise de concentração celular. Uma caracterização da biomassa seria necessária para verificar se ocorre apenas a separação do *Bacillus firmus*, pois as imagens obtidas por microscópio não foram suficientemente eficazes;
- Caracterização dos amidos comerciais utilizados, pois verificou-se valores ligeiramente superiores principalmente na formação de γ -CDs;
- Estudar a viabilidade da utilização da biomassa centrifugada (*Bacillus firmus*) em substituição do extrato de levedura;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBEHAUSEN, C.; FORMIGA, A. L.; SABADINI, E.; YOSHIDA, I. V. α -cyclodextrin/siloxane hybrid polymer: synthesis, characterization and inclusion complexes, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, p.1867-1876, 2010.
- ABDEL-SHAFI, A.A.; AL-SHIHRY, S.S. Fluorescence enhancement of 1-naphthol-5-sulfonate by forming inclusion complex with β -cyclodextrin in aqueous solution, **Spectrochimica Acta A**, v.72, p.533-537, 2009.
- AGUIAR, C.L.; Ciclodextrina Glicosiltransferase, Produção, Ação e Aplicação. **B.CEPPA**, v.19, p. 119-138, 2001.
- ALEXANDER, R. J. Maltodextrins: production, properties, and applications. In: SCHENCK, F. W.; HEBEDA, R. E. (Ed.). **Starch hydrolysis products: worldwide technology, production and applications**. New York: VCH Publishers, 1992. p.233-275.
- ALVES-PRADO, H. F.; HILÁRIO, E. Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. **Brazilian Journal Food Technology**, v.5, p.189-196, 2002.
- AMARAL, L. I. V.; GASPAR, M.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P.M.; BUCKERIDGE, M.S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v.34, p.425-431, 2007.
- ANDREAUS, J.; DALMOLIN, M, C.; OLIVEIRA JR, I. B.; BARCELLOS, I, O. Application of cyclodextrins in textile processes. **Química Nova**, v.33, p.929-937, 2010.
- ARTISAN TECHNOLOGY GROUP. Disponível em: http://www.artisanng.com/ViewImage.aspx?Image=NewBrunswick_BioFloIII_View1.JPG%20&Item=58748 Acesso em: 14 de janeiro de 2015
- ASTRAYA, G.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; MEJUTO, J.C.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.1631-1640, 2009.
- AVCI, A.; DÖNMEZ, S. Purification and characterization of a thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacter* sp. P4. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p.10407-10415, 2012.
- AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.16, p.89-97, 2005.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1986.
- BARROS, R.B. Obtenção de amido e seus derivados. **Refinações de Milho Brasil Ltda**. 35p., 1984.

BECK, E.; ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, p.95-117, 1989.

BERGAMASCO, R.C.; ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. Sulfluramid volatility reduction by β -cyclodextrin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.53, p.1139-1143, 2005.

BERTELMANN, E.; PLEYER, U. Immunomodulatory therapy in ophthalmology – is there a place for topical application?. **Ophthalmologica**, v.218, p.359-367, 2004.

BERTOLINI, A.C.; CEREDA, M. P.; CHUZEL, G. Fécula e farelo de mandioca como substrato na produção de ciclodextrinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, p.224-229, 1998.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P. A. **Química de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.

BON, E. P. S.; PEREIRA, JR., N. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: EPS Bon, 1999.

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

BOOGAARD, van den, M. **Cyclodextrin-containing supramolecular structures: from pseudo-polyrotaxanes towards molecular tubes, insulated molecular wires and topological networks**. 2003. (Ph.D. Thesis) – University of Groningen, The Netherlands, 2003.

BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**, v.1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

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

BRUICE, P.Y. **Química orgânica**. v.2. 4 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. **As rotas para o etanol celulósico no Brasil**. Departamento de Botânica – IBUSP, 2010.

BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p.85-112, 1998.

CAO, X.; JIN, Z.; WANG, X.; CHEN, F. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus* species: purification and characterization. **Food Research International**, v.38, p.309-314, 2005.

CARMELLO, J.B.; WINTER, C.; ZANIN, G.M.; OLIVO, J. E. Estudo do efeito do extrato de levedura e do amido de milho no cultivo de *Bacillus firmus* CEPA 37 para a produção da enzima ciclomalto-dextrina-glicano-transferase (CGTASE). **Anais do VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar**, Maringá-PR, 2011.

CARNEIRO, A.A.J.; ALVES-PRADO, H.F.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Escurecimento enzimático em alimentos: ciclodextrinas como agente antiescurecimento. **Alimentos e Nutrição**, v.17, p.345-352, 2006.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001b. v.2, cap.10, p.205-218.

CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. **Engenharia Bioquímica**. In: BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONI, E. 1975. v.3, cap.9, p.105-111.

CENTINI, M.; MAGGIORE M.; CASOLARO, M.; ANDREASSI, M.; FACINO, R.M.; ANSELMI, C. Cyclodextrins as cosmetic delivery systems. **Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemistry**, v.57, p.109-112, 2007.

CEREDA, P.M.; VILPOUX, O. Processamentos de amiláceas latino americanas, cultura de tuberosas amiláceas latino americanas. Fundação Cargil, p.475-495, São Paulo-SP, 2004.

CHAPLIN, M. **Water structure and Science**. 2014. Disponível em: <<http://www1.lsbu.ac.uk/water/cyclodextrin.html>>. Acesso em: 23 mai. 2014.

CHO, S.H.; KIM, S.Y.; LEE S.I.; LEE Y.M. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes for transdermal delivery: preparation, inclusion properties, stability, and release behavior. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.12, p.50-59, 2001.

CHOCIAI, M. B.; MACHADO, I. M. P.; FONTANA, J. D.; CHOCIAI, J. G.; BUSATO, S. B.; BONFIM, T. M. B. Cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) em processo descontínuo alimentado para produção de astaxantina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.38, p.457-462, 2002.

CHRONAKIS, I.S. On the molecular characteristics, composition properties, and structural - functional mechanisms of maltodextrins: a review. **Critical Reviews in Food Science**, v.38, p.599-637, 1998.

CIACCO, C. F.; Cruz, R. **Fabricação de amido e sua utilização**. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 152p. (Série Tecnologia Agroindustrial, 07), 1982.

COSTA, G. L.; PAZZETTO, R.; BROL, F.; MATIOLI, G. Metodologia de seleção de CEPAs para produção da ciclodextrina glicosiltransferase e para purificação da enzima. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v.29, p.45-50, 2007.

COULTATE, T. P. **Alimentos: a química de seus componentes**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, v.28, p.1-9, 2007.

DAMASO, M.; FARINAS, C.; SALUM, T. Produção e imobilização de enzimas aplicadas à produção de etanol e biodiesel. **Embrapa Instrumentação - Capítulo em livro técnico científico**, 2013.

DA SILVA, J.R., Demanda de Amido deve favorecer a cultura de mandioca. **Análises e indicadores do agronegócio**, v.5,n.6,2004.

DE LEMOS, S. E. **Efeito da adição do amido de Batata nas propriedades reológicas da massa de trigo e na formação de amido resistente**. 2002. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2002.

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

DENARDIN, C., C.; DA SILVA, L.P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v.39, p.945-954, 2009.

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

DOKIC, L.; JAKOVLJEVIC, J.; DOKIC, P. Relation between viscous characteristics and dextrose equivalent of maltodextrins. **Starch/Starke**, v.56, p.520-525, 2004.

DUCHÊNE, D.; DEBRUÈRES, B.; BRÉTILLON, A. Les cyclodextrines nature, origine et intérêt en pharmacie galénique. **Labo-Pharmaceutical Problems Technology**, v.32, p.843-850, 1984.

ELIASSON, A.C. **Starch in food – Structure, function and applications**. New York: Boca Raton, CRC, 2004, 605p.

FALCONE, M.; MARQUES, A. B. Estudo sobre as condições de hidrólise do HCl na dosagem de açúcares redutores totais (A.R.T.). **Tecnologia de Alimentos e Bebidas**, v.4, p.24-30, 1965.

FEET, R.; DINIZ, A.C.P.; LUIZ, M.B.; GONZAGA, L.V.; MEIER, M. M.; SZPOGANICZ, B. Comportamento da β -ciclodextrina adicionada ao leite de cabra submetido ao processo de desidratação por "spray-dryer". **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.197-201, 2005.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza - Espanha: Editorial Acribia, S.A., 2000.

FERNANDES, L. P.; ULHOA, C. J.; ASQUIERI, E. R.; MONTEIRO, V.N. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.4, p.43-51, 2007.

FERREIRA, V., F.; DA ROCHA, D.R.; DA SILVA, F.C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v.32, p.623-638, 2009.

FILHO, W.G.V.; MENDES, B.P. Fermentação alcoólica de raízes tropicais. In: Cereda, M. P. Vilpoux, O. (Eds). Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. Fundação Cargill, São Paulo, v.3, p.530-575, 2003.

FOELKEL, C. Aplicações da biotecnologia em processos industriais de fabricação de celulose de eucalipto. **Eucalyptus Online Book e Newsletter**, p.47-58, 2013.

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v.31, p.2091-2099, 2008.

FRANCISCO JUNIOR, W.E. Carboidratos: estrutura, propriedades e funções. **Química Nova na Escola**, v.29, p.8-13, 2008.

FRANCO, C.M.L.; DAIUTO, E.R.; DEMIATE, I.M.; CARVALHO, L.J.C.B.; LEONEL, M.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F.; SARMENTO, S.B.S. **Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas: propriedades gerais do amido**. Campinas: Fundação Cargill, v.1, 224 p., 2001.

FRENCH, D. The schardinger dextrans. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v.12, p.189-260, 1957.

FRÖMMING, K. H.; SZEJTLI, J. **Cyclodextrins in Pharmacy**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 224 p., 1994.

GADEN, E. L. JR. Fermentation process kinetics. **Journal of Biochemical and Microbiology Technology and Engineering**, v.1, p.413-429, 1959.

GAMA, M.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. Engenharia Enzimática. Portugal: Lidel – Edições Técnicas, 2003.

GAWANDE, B. N.; GOEL, A.; PATKAR, A. Y.; NENE, S. N. Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p.504-509, 1999.

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

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. D. Thermostable enzymes: sources, production and industrial applications. **Química Nova**, v.30, p.136-145, 2007.

GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de α -amilase e glucoamilase termoestável pelo fungo termófilo *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

GUNARATNE, A.; CORKE, H. Influence of unmodified and modified cycloheptaamylose (β -cyclodextrin) on transition parameters of amylase-lipid complex and functional properties of starch. **Carbohydrate Polymers**, v.68, p.226-234, 2007.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

HAIYEE, Z.A.; SAIM, O.; SAID, M.; ILLIAS, R.M.; MUSTAPHA, W.A.W.; HASSAN, O. Characterization of cyclodextrin complexes with turmeric oleoresin. **Food Chemistry**, v.114, p.459-465, 2009.

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

HASHIMOTO, Y.; YAMAMOTO, T.; FUJIWARA, S.; TAKAGI, M.; IMANAKA, T. Extracellular synthesis, specific recognition, and intracellular degradation of cyclomalto-dextrins by the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. strain B1001. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.5050-5057, 2001.

HIGUTI, I.H.; GRANDE, S.W.; SACCO, R.; NASCIMENTO, A.J. Isolation of alkalophilic CGTase-producing bacteria and characterization of cyclodextrin-glycosyltransferase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, p. 183-186.

HIMEDIA. Disponível em: <http://www.himedialabs.com.br/produtos/detail.asp?iPic=1002&iType=39>. Acesso em: 21 abril. 2014.

HISS, H.; GOMBERT, A.K. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial v.2 – Engenharia Bioquímica**, São Paulo: Edgard Blucher, 2001, cap.6, p.93-122.

HODI, K.; TASIC, L.; KATA, M.; SELMECZI, B.; JOVANOVIC, M.; DJURIC, Z. Morphological study of products containing β -Cyclodextrin. **Starch/Starke**, v.43, p.186-190, 1991.

IUPAC. Nomenclature of Inorganic Chemistry (Recommendations 1990), 1990, Blackwell Scientific Publications.) (IUPAC, Nomenclature of Organic Chemistry (Sections A, B, C, D, E, F, and H, 1979 Edition), Pergamon Press, 1979.

JESSEL, N.; OULAD-ABDEIGHANI, M.; MEYER, F.; LAVALLE, P.; HAIKEL, Y.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J. C. Multiple and time-scheduled *in situ* DNA delivery mediated by β -cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of America**, v. 103, p.8618-8621, 2006.

JUNIOR, A.S.C.; FERNANDES, V.C.; DENADAI, A.M.L.; MILLÁN, R.D.S.; ALVES, R. J. Caracterização físico-química de complexos de insulina:dimetil-b-ciclodextrina e insulina:hidroxipropil-b-ciclodextrina e avaliação da influência do tipo de complexo na produção de microesferas biodegradáveis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, 2007.

KATO, T.; HORIKOSHI, K. Colorimetric Determination of γ -Cyclodextrin. **Analytical Chemistry**, v.56, p.1738-1740, 1984.

KHALAFI, L.; RAFIEE, M. Cyclodextrin Based Spectral Changes. **Intech**. 2013. Disponível em: <<http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/45054.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2014.

KHAN, A. R.; FORGO, P.; STINE, K. J.; D'SOUZA, V. T. Methods for Selective Modifications of Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v.98, p.1977-1996, 1998.

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

LEAL, R.C.; MOITA NETO, J.M.; Amido : Entre a Ciência e a Cultura. **Química Nova Escola**,v.35, p.75-78, 2013.

LEDUY, A.; ZAJIC, J. E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: Applied to growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.15, p.805-810, 1973.

LEMO, E.G.M.; STRADIOTTO, N.R. Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação. São Paulo. Cultura Acadêmica, 2012.

LI, J.H.; VASANTHAN, T.; HOOVER, R.; ROSSNAGEL, B.G. Starch from hull-less barley: V. In-vitro susceptibility of waxy, normal and high-amylose starches towards hydrolysis by α -amylases and amyloglucosidase. **Food Chemistry**, v.84, p.621-632, 2004.

LI, J.H.; VASANTHAN, T.; HOOVER, R.; ROSSNAGEL, B.G. Starch from hull-less barley: V. In-vitro susceptibility of waxy, normal and high-amylose starches towards hydrolysis by α -amylases and amyloglucosidase. **Food Chemistry**, v.84, p. 621-632, 2004.

LIU, H.; GU, Z-B.; HONG, Y.; LI, Z-F. Complexation of γ -Cyclodextrin with bromocresol Green. **Chemical Journal of Chinese Universities**, v.29, p. 1773 -1776, 2008.

LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.329, p.1-11, 2007.

LU, Z.; CHENG, B.; HU, Y.; ZHANG, Y.; ZOU, G. Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.113, p.17-20, 2009.

MACHADO,V.G.; MACHADO,C.; VENTURINI,C.G.; NICOLINI,J. Properties and recent applications of cyclodextrins. **Química Nova**,v.31,p.360-368, 2008

MAHAT, M.K.; ILLIAS, R.M.; RAHMAN, R.A.; RASHID, N.A.A.; MAHMOOD, N.A.N.; HASSAN, O.; AZIZ, S.A.; KAMARUDDIN, K. Production of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1: media optimization using experimental design. **Enzyme Microbial Technology**, v.35, p.467- 473, 2004.

MALDONADE, I.R.; CARVALHO, P.G.B.; FERREIRA, N.A. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. **Comunicado Técnico 85**. Embrapa Hortaliças. Brasília-DF, 2013.

MARCHAL, L.M.; BEEFTINK, H.H.; TRAMPER, J. Towards a rotational design of commercial maltodextrins. **Food Science Technology**, v.10, p.345-355, 1999.

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

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

MATIOLI, G.; ZANIN, G. M.; GUIMARÃES, M. F.; MORAES, F. F. Production and purification of CGTase of alkalophilic *Bacillus* isolated from Brazilian soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70-72, p.267-275, 1998.

MATTERNM, H.M.; RAIKAR, L.S.; HARDIN, C.D. The effect of caveolin-1 (Cav-1) on fatty acid uptake and CD36 localization and lipotoxicity in vascular smooth muscle (VSM) cells. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 1, p.1-14, 2009.

MAZONI, R.B.; MARIOWAKI, C.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M.; MATIOLLI, G. Propriedades da ciclodextrina glicosiltransferase produzida por *Bacillus firmus* alcalofílico. **Arquivos de Ciência e Saúde da Unipar**, v.4, 2000.

MISHRA, S.; RAI, T. Morphology and Functional properties of corn, potato and tapioca starches. **Food Hydrocolloids**, p.1-10, 2005.

MONTEIRO, V.N.; SILVA, R.N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. jan/jun, 2009.

MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório - Princípios e Interpretações**. Medbook, 2009.

MYLLÄRINEN, P.; BULEON, A.; LAHTINEN, R.; FORSELL, P. The crystallinity of amylose and amylopectin films. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p.41-48, 2002.

NAKAMURA, A.; HAGA, K.; YAMANE, K. Four aromatic residues in the activecenter of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011. Effects of replacements on substratebinding and cyclization characteristics. **Biochemistry**, v.33, p.9929-9936, 1994.

NAMAZI, H.; KANANI, A. Investigation diffusion mechanism of b-lactam conjugated telechelic polymers of PEG and b-cyclodextrin as the new nanosized drug carrier devices. **Carbohydrate Polymers**, v.76, p.46-50, 2009.

NAVES, R. F.; FERNANDES, F. S.; PINTO, O.G.; NAVES, P. L. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.6, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de Bioquímica**. Ed. Sarvier, 3^{ed.}, São Paulo, p.100-103, 2002.

OLIVO, J. E. **Efeito da concentração inicial de microrganismos (*s.cerevisiae*) e da recirculação de células em parâmetros cinéticos de processos simultâneos de sacarificação e fermentação de meios preparados a partir de farinha de raspa de mandioca**. 1985. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

OONNITTAN, A.; SHRESTHA, R.A.; SILLANPAA, M. Removal of hexachlorobenzene from soil by electrokinetically enhanced chemical oxidation. **The Journal of Hazardous Materials**, v.162, p.989–993, 2009.

PARK, K.; KIM, T.; CHEONG, T.; KIM, J.; OH, B.; SVENSSON, B. Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the α -amylase family. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1478, p.165-185, 2000.

PARKER, R.; RING S. G. Aspects of the physical chemistry of starch. **Journal of Cereal Science**, v.34, p.1-17, 2001.

PASQUINI, N. C.; PASQUINI, N.L.S. Bioequivalence of azithromycin free and complexed in β -cyclodextrins. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.1, p.46-51, 2008.

PEREIRA JR., N.; EPS, B.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de Bioprocessos**. Séries em Biotecnologia, Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008.

POLESI, L.F. Amido Resistente: Aplicações e Métodos de Produção, **B.CEPPA**, Curitiba, v. 29, n. 2, 2011.

PROVENZI, G.; FALCÃO, L.D.; FETT, R.; LUIZ, M.T.B. Estabilidade de antocianinas de uvas cabernet sauvignon com β - e γ -ciclodextrinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, p.165-170, 2006.

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

QI, Q.; ZIMMERMANN, W. Cyclodextrin glucanotransferase : from gene to applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.66, p.475-485, 2005.

RAHMAN, K.; ILLIAS, R.M.; HASSAN, O.; MAHMOOD, N.A.N.; RASHID, N.A.A. Molecular cloning of a cyclodextrin glucanotransferase gene from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1 and characterization of the recombinant enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.74-84, 2006.

RAWAT, S.; JAIN, S.K. Solubility enhancement of celecoxib using β -y clodextrin inclusion complexes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p. 263-267,

2004.

RIBEIRO, J. N.; FLORES, A.V. Terapia Fotodinâmica: uma luz na luta contra o câncer. **Physicae**, 2005. Disponível em: <<http://physicae.ifi.unicamp.br/physicae/article/view/144>>. Acesso em: 14 mar. 2014.

RICARDO, C. P.; TEIXEIRA A. **Enzimas**, Didática Editora, 1976.

ROCHA, T.S.; CARNEIRO, A.P.A.; FRANCO, C.M.L. Effect of enzymatic hydrolysis on some physicochemical properties of root and tuber granular starches. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2010.

RODAL, S.K.; SKRETTING, G.; GARRED, O.; VILARDT, F.; DEURS B.; SANDVIG, K. Extraction of cholesterol with methyl- β -cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. **Molecular Biology of the Cell**, v.10, p.961-974, 1999.

ROSA, M.F.; SAVARIZ, F.C. Síntese e estudo da fotoestabilidade de derivados azalactônicos encapsulados em β -ciclodextrina. **Eclética Química**, v.30, p.75-81, 2005.

RUDKEVICH, D.M.; LEONTIEV, A.V. Molecular Encapsulation of Gases. **Australian Journal of Chemistry**, v.57, p.713-722, 2004.

RUDNIK, E. **Compostable polymer materials**. Oxford: Elsevier, 2008.

SANDHU, K.S.; SINGH, N.; LIM, S.T. A comparison of native and acid thinned normal and waxy corn starches: Physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.40, p.1527-1536, 2007.

SANTORO, M.I.R.M.; SINGH, A.K.; AKEDOR-HACKMANN, E.R.M. Cromatografia líquida com fase quiral aplicada na separação enantiomérica de fármacos cardiovasculares. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42, p. 553-566, 2006.

SANTOS, F.L.; GANDRA, M.; FIGUEIREDO, H. M. Utilização de resíduos de mandioca para a produção de bioetanol: uma proposta para o semiárido baiano. **Diálogos e Ciência**, ano VI, n. 14, 2008.

SANTOS, J., B. C.; ZANIN, G.M.; OLIVO, J.E. Influence of culture medium pH on the production of CGTase by *Bacillus firmus* Strain No. 37. **Acta Scientiarum**, v.35, p.413-416, 2013.

SASIKALA, K.; ARUNACHALAM, S. Studies on outer-sphere electron transfer between iron(II) and some surfactant-cobalt (III) complexes in micelles as well as in β -cyclodextrin. **Colloid and Surface A**, v.335, p.98-102, 2009.

SAVERGAVE, L.S.; DHULE, S.S.; JOGDAND, V.V.; NENE, S. N.; GANDRE, R.V. Production and single step purification of cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic *Bacillus firmus* by ion exchange chromatography. **Biochemical Engineering Journal**, v.39, p.510-515, 2008.

SCHENCK, F.W.; HEBEDA, R.E. **Starch Hydrolysis Products**, Vhc, New York, 1992, p.233-275.

SENE, L.; VITOLO, V.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Effect of enviromental conditions on xylose reductase and xylitol desidrogenase production in *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p.371-380, 2000.

SEON, K.H.; AHN, J.; KWAK, H.S. The accelerated ripening of cholesterol- reduced cheddar cheese by crosslinked β -cyclodextrin. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.49-57, 2009.

SEVERO, M. G.; MORAES, K.; RUIZ, W. A. Modificação enzimática da farinha de arroz SIGMA ALDRICH. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/31410?lang=pt®ion=BR>. Acesso em: 21 abril 2014.

SILVA, F.A.; ALCÂNTARA, E.F.C.; MONTEIRO, V.N. Imobilização covalente na superfície de sílica gel da enzima beta-1,3glucanase produzida por *Trichoderma Harzianum*. **Revista Processos Químico**, v.10, p.25-34, 2011.

SILVA, R.J.; STEPHAN, M.P.; TEIXEIRA, K.R.S. Interferência na quantificação de proteínas em cultura de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em meio semi-sólido contendo glicose. **Comunicado técnico 121**. EMBRAPA, Agrobiologia, 2009.

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

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

SVENSSON, D.; ULVENLUND, S.; ADLERCREUTZ, P. Efficient synthesis of a long carbohydrate chain alkyl glycoside catalyzed by Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase). **Biotechnology and Bioengineering**, v.104, p.854-861, 2009.

SZEJTLI, J. The cyclodextrins and their applications in biotechnology. **Carbohydrate Polymers**, v.12, p.375-392, 1990.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.137-142, 2004.

TACHIBANA, Y.; KURAMURA, A.; SHIRASAKA, N.; SUZUKI, Y.; YAMAMOTO, T.; FUJIWARA, S.; TAKAGI, M.; IMANAKA, T. Purification and characterization of an extremely thermostable cyclomaltodextrin glucanotransferase from a newly isolated hyperthermophilic archeon, a *Thermococcus* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1991-1997, 1999.

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

TERADA, Y.; YANASE, M.; TAKATA, H.; TAKAHA, T.; OKADA, S. Cyclodextrins are not the major cyclic alpha-1,4-glucans produced by the initial action of cyclodextrin

glucanotransferase on amylose. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.15729-15733, 1997.

TESTER, R. F.; QI, X.; KARKALAS, J. Hydrolysis of native starches with amylases. **Animal Feed Science and Technology**, v.130, p.39-54, 2006.

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

TORRES, L.M.; LEONEL, M.; MISCHAN, M.M. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. **Ciência Rural**, v.42, 2012.

UITDEHAAG, J. C. M.; MOSI, R.; KALK, K.H.; VAN DER VEEN, B. A.; DIJKHUIZEN, L.; WITHERS, S. G.; DIJKSTRA, B. W. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glucosyltransferase elucidate catalysis in the alpha-amylase family. **Nature Structural Biology**, v. 6, p.432-436, 1999.

VAN DER MAAREAL, M.J.E.C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. **Journal of Biotechnology**, v.94, p.137-155, 2002.

VAN DER VEEN, B.A.; UITDEHAAG, J.C.M.; PENNINGA, D.; ALEBEEK, G.W.M.; SMITH, L.M.; DIJKSTRA, B.W.; DIJKHUIZEN, L. Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase -cyclodextrin production. **Journal of Molecular Biology**, v. 296, p. 1027-1038, 2000a.

VAN DER VEEN, B.A.; VAN ALEBEEK, G.J.W.M.; UITDEHAAG, J.C.M.; DIJKSTRA, B.W.; DIJKHUIZEN, L. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p.658-665, 2000.

VASCONCELOS, R.F.; LIRIO, C.F.S.; BOUHID, R.R. Carbon dioxide capture by reactive absorption with amines. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v.3, p. 17-61, 2011.

VAZ, R.S.; PRADO, M. R. M.; CARVALHO, F. Biotecnologia na indústria farmacêutica: revisão dos principais processos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.10, p. 36-39, 2008.

VEIGA, F.; RIBEIRO RAMA, A.C.; FIGUEIREDO, I.V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. Biopharmaceutical aspects of drug formulation for neonatology. Rational for indomethacin's complexation with hydroxypropyl-b-cyclodextrin to treat patent ductus arteriosus. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, p. 281-299, 2005.

VEIGA, F.; SALTÃO, R. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêutico. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.37, p.1-17, 2001.

VIGLIANTI, C.; HANNA, K.; DE BRAUER, C.; GERMAIN, P. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aged-contaminated soil using cyclodextrins: Experimental study. **Environmental Pollution**, v.140, p.427-435, 2006.

VIKMON, M. Rapid and simple spectrophotometric method for determination of micro-amounts of cyclodextrins. **Proceedings of the first international symposium on cyclodextrins**. Advances in Inclusion Science, v.1, p. 69-74, 1982.

visando a produção de amido resistente. **Química Nova**, v. 33, p. 345-350, 2010.

WANG, Y.J.; WANG, L. Physicochemical properties of common and waxy corn starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. **Carbohydrate Polymers**. v.52, p.207-217, 2003.

YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Fed batch techniques in microbial processes. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, v.30, p.147-194, 1980.

YAMANOI, T.; KOBAYASHI, N.; TAKAHASHI, K.; HATTORI, K. **Letters in Drug Design & Discovery**, v., p.188, 2006.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v.26, p.787-793, 1998.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Tecnologia de imobilização de células e enzimas aplicada à produção de álcool de biomassas. Relatório nº 2, Junho/87, p. 315-321, 1987

ANEXOS

Obtenção das Curvas de Calibração

As curvas de calibração utilizadas nos ensaios para as determinações espectrofotométricas de Açúcares Redutores Totais (ART), Açúcares Redutores (AR), Concentração Celular (CC), Proteínas Solúveis (PS), Atividade Enzimática (A) e Atividade Enzimática Específica (AE) serão apresentadas neste item. Para a Concentração Celular (CC), foi utilizada a curva de calibração obtida por MARQUES (2004).

Curva de Calibração para Determinação de Açúcares Redutores e Açúcares Redutores Totais

As metodologias para preparação das curvas de calibração de AR e ART, estão descritos no item 3.3.6 e 3.3.7. A Tabela 1 e a Figura 1 apresentam os dados e resultados obtidos.

Tabela 1 – Resultados das absorbâncias obtidos para diferentes concentrações de solução de Glicose + Frutose utilizando método espectrofotométrico

Concentração glicose+frutose (mg/mL)	Abs 1 (600 nm)	Abs 2 (600 nm)	Média
0	0	0	0
0,05	0,006	0,006	0,006
0,1	0,022	0,018	0,02
0,15	0,042	0,038	0,04
0,2	0,068	0,063	0,0655
0,25	0,08	0,085	0,0825
0,3	0,127	0,129	0,128
0,35	0,156	0,153	0,1545
0,4	0,165	0,165	0,165
0,45	0,208	0,202	0,205
0,5	0,229	0,226	0,2275
0,55	0,25	0,229	0,2395
0,6	0,278	0,279	0,2785
0,65	0,298	0,289	0,2935
0,7	0,312	0,299	0,3055
0,75	0,353	0,351	0,3520
0,8	0,352	0,369	0,3605
0,85	0,395	0,398	0,3965
0,9	0,396	0,45	0,423
0,95	0,422	0,453	0,4375
1	0,43	0,511	0,4705

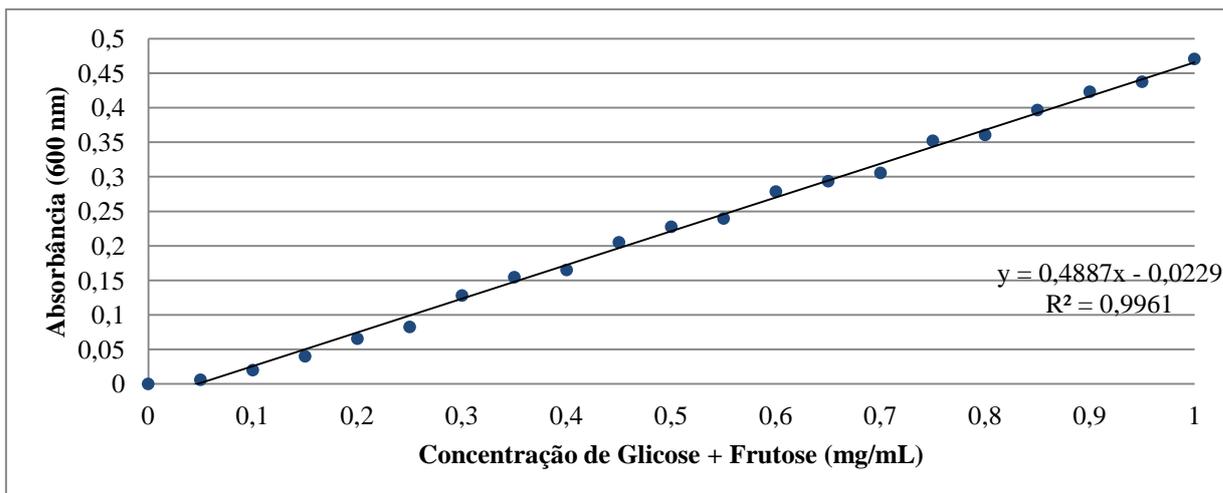


Figura 1 – Curva de calibração para o reagente DNS com concentrações de Glicose +Frutose conhecidas.

Utilizando a regressão linear obteve-se o ajuste da equação da reta, dado por:

$$0,4887.X - 0,0229 \qquad R^2 = 0,9961 \qquad (\text{Eq.1})$$

Onde Y é a absorbância (nm) e X a concentração de ART ou AR (g/L).

Curva de Calibração Para Dosagem de Proteínas Solúveis

A metodologia utilizada na preparação da curva de calibração para dosagem de proteína é apresentada no item 3.3.5. A Tabela 2 e a Figura 2 apresentam os resultados obtidos da curva padrão para determinação do teor de proteína da enzima CGTase.

Tabela 2 – Valores de absorbância para dosagem de proteínas solúveis utilizando método de Bradford

Concentração de Proteínas Solúveis (mg/mL)	Abs 1 (595 nm)	Abs 2 (595 nm)	Média
0	0	0	0
0,01	0,071	0,071	0,071
0,02	0,134	0,137	0,1355
0,03	0,195	0,191	0,193
0,04	0,226	0,286	0,256
0,05	0,31	0,31	0,31
0,06	0,347	0,349	0,348
0,07	0,407	0,379	0,393
0,08	0,45	0,427	0,4385
0,09	0,461	0,47	0,4655
0,1	0,468	0,457	0,468

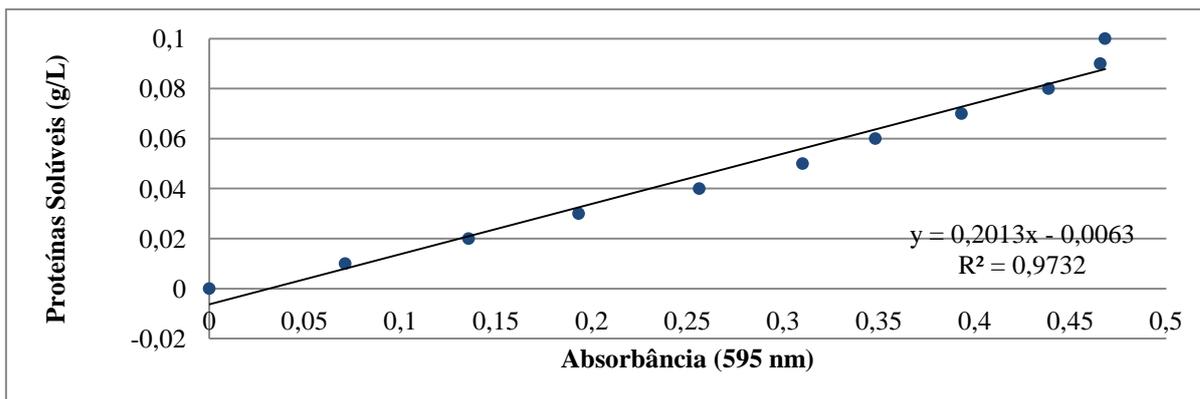


Figura 2 – Curva padrão para dosagem de proteínas solúveis pelo método de Bradford, dados referentes à Tabela 2.

$$Y = 0,2013.X - 0,0063 \quad R^2 = 0,9732 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde Y representa a concentração de proteínas solúveis em mg/mL e X a absorbância da solução contendo concentrações diferentes de proteínas solúveis lidas a 595 nm.

Curva de Calibração de β -CD

Para obtenção da curva de calibração de β -CD foi utilizada a metodologia descrita no item 3.3.3. A Tabela 3 e a Figura 3 apresentam os resultados obtidos, os dados foram ajustados por regressão linear no software STATÍSTICA 7.0, estimando o valor da constante de equilíbrio do complexo β -ciclodextrina-fenolftaleína ($k_{\beta\text{-CD}}$).

Tabela 3 – Valores de absorbância em função da concentração de β -CD, obtidos por método colorimétrico de fenolftaleína.

Concentração de β -CD (g/L)	Concentração de β -CD (mM)	Abs1 (550 nm)	Abs2 (550 nm)	Média
0	0	1,725	1,725	1,725
0,1	0,0881057	1,547	1,57	1,5585
0,2	0,1762115	1,425	1,414	1,4195
0,3	0,2643172	1,277	1,292	1,2845
0,4	0,3524229	1,16	1,163	1,1615
0,5	0,4405286	1,043	1,046	1,0445
0,6	0,5286344	0,956	1,008	0,982
0,7	0,6167401	0,88	0,869	0,8745
0,8	0,7048458	0,804	0,793	0,7985
0,9	0,7929515	0,763	0,738	0,7505
1	0,8810573	0,679	0,674	0,6765

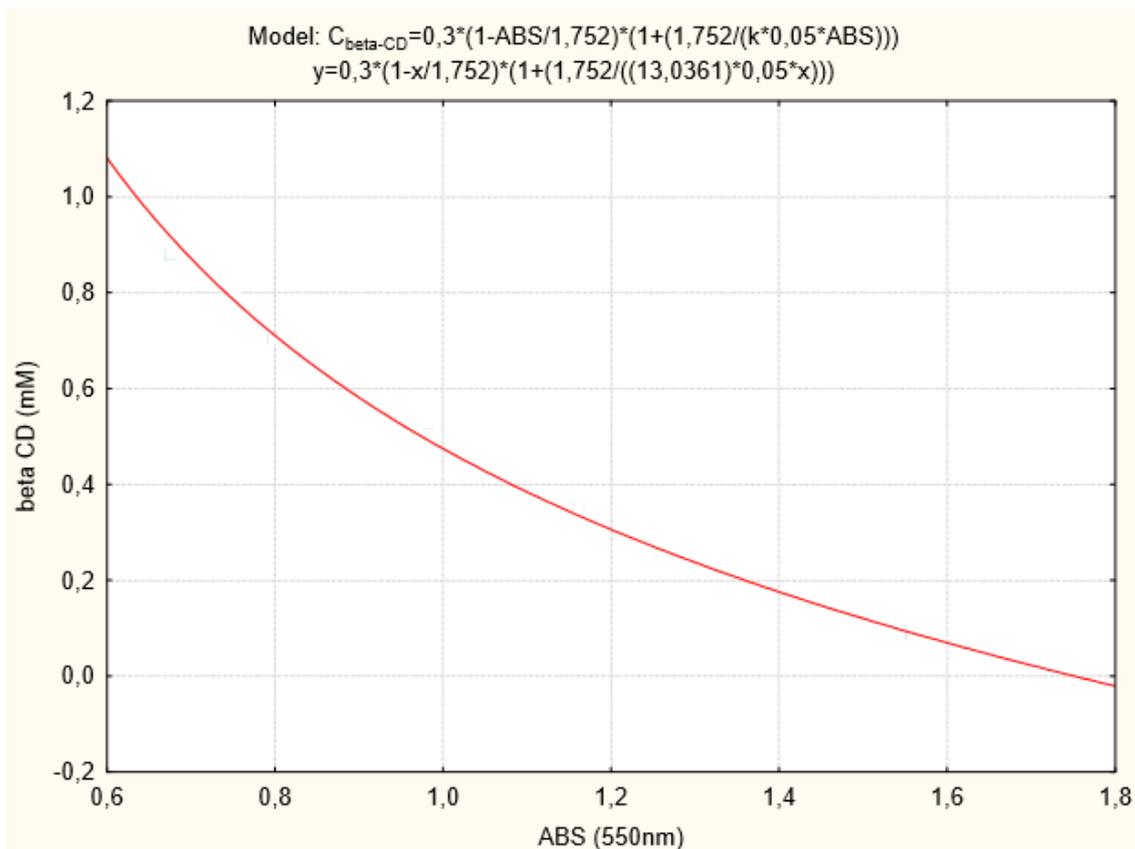


Figura 3 – Curva de dosagem de β -CD pelo método colorimétrico da fenolftaleína.

De acordo com a teoria da complexação descrito no item 3.3.3, e os dados obtidos:

$$C_{\beta-CD} = 0,3 \times \left(1 - \frac{Abs}{Abs_0}\right) \times \left[1 + \frac{1,752}{(13,0361 \times 0,05 \times Abs)}\right] \quad R^2 = 0,998$$

	Model: Var2=0,3*(1-Var1/1,752)*(1+(1,752/(k*0,05*Var1))) (Spreadsheet1)
	Dep. var: Var2 Loss: (OBS-PRED)**2
	Final loss: ,003415098 R= ,99800 Variance explained: 99,600%
N=11	k
Estimate	13,03607

Onde :

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

Abs = Absorbância da solução de dosagem na presença de CD lida a 550 nm;

Abs₀ = Absorbância da solução de dosagem na ausência de CD lida a 550 nm.

Curva de Calibração de γ -CD

As dosagens de soluções padrões de γ -CD são apresentadas na Tabela 4 e Figura 4, obtidos pela metodologia descrita no item 3.3.4

Tabela 4 – Valores de absorvância em função das concentrações conhecidas de γ -CD, obtidos por método colorimétrico do verde de bromocresol (VBC).

Concentração de γ -CD (mM)	ABS1 (620 nm)	ABS2 (nm)	Média
0	0	0	0
0,2	0,136	0,131	0,1335
0,4	0,15	0,146	0,148
0,6	0,165	0,162	0,1635
0,8	0,187	0,179	0,183
1	0,199	0,195	0,197
1,2	0,215	0,213	0,214
1,4	0,257	0,248	0,2525
1,6	0,263	0,264	0,2635
1,8	0,274	0,268	0,271
2	0,328	0,322	0,325

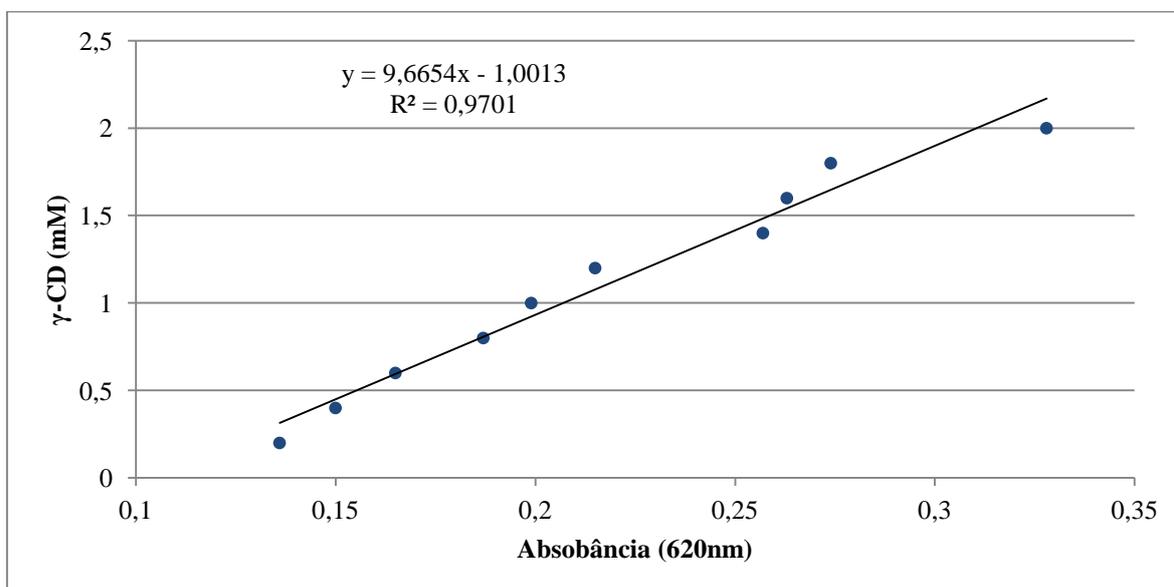


Figura 4 - As dosagens de soluções padrões de γ -CD

A equação obtida por regressão linear é dada por:

$$Y = 9,6654 \cdot X - 1,0013$$

$$R^2 = 0,9701$$

Onde Y representa a concentração de γ -CD em mM e X a absorvância da solução contendo concentrações diferentes de γ -CD lidas a 620 nm.

RESULTADOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 2

Tempo (h)	ART (g/L)	AR (g/L)	pH	CC (g/L)	PS (g/L)	A β -CD (U/mL)	A γ -CD (U/mL)	A.E β -CD (U/mg)	A.E γ -CD (U/mL)
0	36,9696969	4,292780	9,96	2,363951	0,120003	0,0052	0,0198	0,00133329	0,1649956
8,5	19,27807487	4,0565954	9,1	1,6722592	0,118196	0,00016	0,0458	0,01522894	0,387491963
12	13,84135472	3,8716578	8,65	3,6421967	0,1364688	0,0018	0,03	0,017586437	0,219830467
24	12,90552585	3,561943	8,36	3,8885257	0,135264	0,0024	0	0,00443577	0
32	12,01426025	2,7687166	8,2	5,4270727	0,1244208	0,0006	0	0,017681931	0
36	6,978609626	2,2116756	7,99	5,0625058	0,1336576	0,0022	0	0,013467248	0
48	2,47771836	0,7299465	7,27	6,3138571	0,1167904	0,0018	0,0392	0,017124695	0,335644026
56	2,165775401	0,6809269	7,93	7,0479175	0,1469104	0,002	0,03	0	0,204206101
59	1,809269162	0,5138146	8,02	7,1760086	0,1426936	0,0036	0,054	0,028032091	0,37843323
72	1,319073084	0,4848485	8,04	7,5996945	0,1545408	0,004	0,066	0,031059759	0,427071686
80	1,140819964	0,342246	8,42	4,0968961	0,137272	0,0048	0,5688	0	4,143598112

Tempo (h)	ART (g/L)	AR (g/L)	pH	CC (g/L)	PS(g/L)	A β -CD (U/mL)	A γ -CD (U/mL)	A.E β -CD (U/mg)	A.E γ -CD (U/mg)
0	38,03922	4,2749554	10,05	1,0278625	0,1344608	0	0	0	0
8,5	17,80749	4,2103387	9,90	2,021061	0,1278344	0,0046	0,019	0,035984054	0,1486298
12	16,3369	3,3636364	9,78	4,0215433	0,131248	0,0032	0,0372	0,024381324	0,2834329
24	13,61854	2,516934	9,55	4,6373658	0,1145816	0,0056	0,0434	0,048873467	0,3787694
32	12,37077	2,0467914	9,48	6,1709863	0,1671912	0,0016	0,0328	0,009569882	0,1961826
36	11,21212	1,3315508	9,28	7,8361703	0,1324528	0,0024	0,0332	0,018119662	0,2506553
48	6,131907	1,0062389	8,80	7,1070365	0,1264288	0	0,0116	0	0,0917512
48,1	24,35829	3,3101604	9,04	5,4615587	0,1109672	0	0,0088	0	0,0793027
56	19,54545	2,9737077	8,93	7,8903627	0,1669904	0,0012	0,0114	0,007186042	0,0682674
59	19,0107	2,1893939	8,95	8,2450764	0,1665888	0,0022	0,1088	0,01320617	0,6531051
72	2,299465	1,5721925	8,91	7,9002158	0,1702032	0,001	0,071	0,00587533	0,4171484
80	2,165775	1,1800357	9,60	3,9983645	0,1605648	0,0004	0	0,002491206	0
84	2,032086	0,9594474	9,48	4,2052808	0,1575528	0,0016	0,0092	0,010155326	0,0583931
96	1,987522	0,2820856	9,84	4,4220504	0,1521312	0,0032	0,0252	0,021034476	0,1656465
96,1	9,652406	2,7397504	9,96	4,0722632	0,1183968	0,0044	0,0716	0,037163167	0,6047461
104	4,037433	2,1893939	9,82	3,8949063	0,1200032	0	0	0	0
108	2,878788	1,9576649	9,70	5,1708905	0,1248224	0,00012	0,0808	0,000961366	0,6473197
120	1,363636	1,5588235	9,77	4,7816907	0,1318504	0,0012	0	0,009101224	0
128	1,541889	1,2290553	9,87	4,648673	0,1350632	0	0,0228	0	0,1688099
132	1,764706	0,9772727	10,10	4,2397669	0,1294408	0,000008	0	6,18043E-05	0
152	3,458111	0,491533	9,92	4,3136656	0,1280352	0,0002	0,0198	0,00156207	0,154645
156	3,190731	0,3667558	9,95	4,1806479	0,1196016	0,001	0,0168	0,008361092	0,1404663
170,5	1,809269	0,2642602	10,03	3,5943849	0,1013288	0,002	0,0596	0,019737725	0,5881842

176	2,655971	0,2419786	9,91	4,2052808	0,1139792	0,002	0,053	0,017547061	0,4649971
180	1,363636	0,1729055	9,94	3,0327548	0,0916904	0,0014	0,0476	0,015268774	0,5191383
192	1,541889	0,1127451	9,21	2,8652511	0,0794416	0,001	0,0288	0,012587863	0,3625305
200,5	1,764706	0,0860071	9,43	2,7568663	0,0782368	0,001	0,1094	0,012781709	1,3983189
204	1,853832	0,1372549	9,41	3,4465875	0,1063488	0,0006	0,0944	0,005641813	0,8876452
216	6,31016	0,2575758	9,89	3,5549723	0,11418	0,0024	0,1006	0,021019443	0,881065
224	24,44742	1,442959	9,94	3,4515141	0,1015296	0,0036	0,0788	0,03545764	0,7761283
228	27,92335	1,5610517	9,29	4,1658682	0,098116	0,0014	0,0168	0,014268825	0,1712259
240	31,44385	1,4050802	9,51	5,5453106	0,0876744	0,005	0,0456	0,05702919	0,5201062
246	23,91266	1,2981283	9,83	5,9443636	0,07904	0,005	0,0232	0,063259109	0,2935223
270	2,878788	1,1599822	9,76	7,3336591	0,0533376	0	0,0006	0	0,0112491
274	1,497326	0,9483066	8,72	6,9789454	0,055948	0,00012	0,005	0,002144849	0,0893687
294,5	0,828877	0,5828877	9,36	8,0332335	0,0535384	0,0006	0,0072	0,011206909	0,1344829
298	2,745098	0,4848485	9,44	7,323806	0,0547432	0	0,0116	0	0,2118985
312	1,541889	0,4826203	9,65	4,8555894	0,0436992	0	0,0004	0	0,0091535
320,5	3,324421	0,478164	9,66	3,2051851	0,0455064	0,0012	0	0,026369917	0
324	2,254902	0,4714795	9,70	3,0327548	0,0392816	0	0	0	0
340	3,057041	0,6096257	9,73	2,5056107	0,0342616	0	0,003	0	0,0875616

RESULTADOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 3

Tempo (t)	ART (g/L)	AR (g/L)	ph	CC (g/L)	PS (g/L)	A β -CD (U/mL)	A γ -CD (U/mL)	A.E β -CD (U/mg)	A.E γ -CD (U/mg)
0	13,217469	3,1073975	10,38	0	0,0151856	0,0112	0	0,7375408	0,34243
7,5	12,370766	3,0606061	9,91	0,0353757	0,0272336	0,0284	0,0052	1,0428294	0
11,5	10,187166	2,1871658	9,51	0,3112642	0,0465104	0,0498	0,0046	1,0707283	0,0989
23,5	3,9928699	0,5450089	9,41	2,6563162	0,0416912	0,1026	0,0158	2,460951	0,37898
31,5	2,5668449	0,4024064	9,13	8,2332048	0,0445024	0,1102	0,0072	2,4762709	0,16179
34,5	1,631016	0,3511586	9,26	8,3120301	0,0342616	0,122	0,0056	3,5608378	0,16345
47	1,0962567	0,328877	9,48	7,3956862	0,0202056	0,105	0,0066	5,1965792	0,32664
55	0,7843137	0,3132799	9,53	4,8929836	0,0181976	0,0996	0,019	5,4732492	1,04409
58	0,7843137	0,3043672	9,54	4	0,0183984	0,0826	0,0134	4,4895208	0,72832
76,5	0,7843137	0,28	9,55	3,2376527	0,0161896	0,0848	0,0058	5,2379305	0,35825

RESULTADOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 4 (Foram realizados 3 conjuntos de ensaio nas mesmas condições)

Ensaio A

Tempo (h)	ART (g/L)	AR (g/L)	pH	CC (g/L)	PS (g/L)	A β -CD (U/mL)	A γ -CD (U/mL)	A.E β -CD (U/mg)	A.E γ -CD (U/mg)
0	14,701065	4,5782146	9,2	0,4295021	0,0613696	0,0034	0	0,0554	0
8	14,660115	4,4348894	9,71	0,54774	0,0814496	0,0078	0,002	0,0958	0,02701057
12	14,004914	3,3927109	9,3	0,5772995	0,0932968	0,0178	0	0,1908	0
25	10,15	2,9054054	9,2	2,8041136	0,1057464	0,0396	0,009	0,3745	0,0870006

36	6,019656	1,981982	9,08	3,5726601	0,1107664	0,0514	0,013	0,464	0,11916971
40	3,8493038	1,3615889	9,17	4,242675	0,1043408	0,067	0,017	0,6421	0,15909405
58	1,3513514	0,6736282	9,04	4,6368014	0,1268304	0,0364	0,012	0,287	0,09303763
60	1,2694513	0,6695332	9,5	4,6368014	0,1298424	0,0656	0,019	0,5052	0,14479092
64	1,2285012	0,6613432	9,48	5,1787252	0,101128	0,0634	0,017	0,6269	0,17008148
76	1,2285012	0,6470106	9,51	5,966978	0,0515304	0,0494	0,03	0,9587	0,58994302
84	1,1875512	0,6347256	9,76	3,4839817	0,0282376	0,0402	0,016	1,4236	0,55953764
88	1,0647011	0,6203931	9,21	3,3263311	0,0382776	0,0634	0,01	1,6563	0,26647439

Ensaio B

Tempo (h)	ART (g/L)	AR (g/L)	pH	CC (g/L)	PS (g/L)	A β -CD (U/mL0)	A γ -CD (U/mL)	A.E β -CD (U/mg0)	A.E γ -CD (U/mg)
0	13,720143	3,5954136	9,94	0,4295021	0,04892	0,0296	0	0,6050695	0
8	10,73975	3,1367731	9,33	0,54774	0,1043408	0,0236	0	0,2261819	0
12	6,5062389	1,9205569	9	5,1984315	0,1097624	0,0272	0,0018	0,247808	0,0163991
25	3,9215686	1,2755938	8,8	9,2185208	0,1135776	0,025	0,0004	0,2201138	0,0035218
36	1,6042781	0,6961507	8,57	9,5436751	0,1167904	0,0236	0,0026	0,2020714	0,0222621
40	1,426025	0,6470106	8,67	8,4598275	0,1189992	0,0248	0,0012	0,2084048	0,0100841
58	1,2923351	0,6203931	8,8	9,2480803	0,1206056	0,0288	0,0022	0,2387949	0,0182413
60	0,9803922	0,6142506	9,22	8,922926	0,1149832	0,0162	0	0,1408901	0
64	0,9803922	0,5937756	9,15	7,9770226	0,1103648	0,0252	0,0134	0	0,1214155
76	0,9803922	0,5814906	9,28	7,7109873	0,1027344	0,0336	0,0118	0	0
84	0,9803922	0,5651106	9,42	8,7849818	0,0862688	0,035	0,0028	0,327057	0,1148593
88	0,9803922	0,4918	9,45	7,3168609	0,092	0,036	0,0027	0,4057087	0,0324567

Ensaio C

Tempo (h)	ART (g/L)	AR (g/L)	pH	CC (g/L)	PS (g/L)	A β -CD (U/mL0)	A γ -CD (U/mL)	A.E β -CD (U/mg0)	A.E γ -CD (U/mg)
0	14,31	4,9365274	9,99	0,7842158	0,0555464	0,0096	0,0012	0,1728285	0,0216036
8	11,7	4,23	9,81	2,3213088	0,0384784	0,0036	0,0006	0,093559	0,0155932
12	8,3128583	3,0569206	9,06	8,430268	0,051932	0,0064	0,0036	0,1232381	0,0693214
25	2,9484029	1,7690418	8,75	8,9918981	0,0491208	0,003	0,0184	0,0610739	0,3745867
36	2,0884521	1,1076986	8,56	11,465041	0,0541408	0,0034	0	0,0627992	0
40	1,2285012	0,7063882	8,81	9,2776398	0,0567512	0,002	0	0,0352415	0
58	1,1875512	0,6879607	9,17	9,0214576	0,0354664	0,0044	0	0,1240611	0
60	1,1466011	0,6961507	9,19	10,854145	0,039884	0,0038	0	0,0952763	0
64	1,0647011	0,6633907	9,28	9,1199892	0,0483176	0,0032	0	0	0
76	1,0647011	0,6142506	9,33	8,982045	0,0412896	0,004	0	0,0968767	0
84	1,023751	0,5814906	9,37	9,602794	0,0493216	0,0044	0,001	0,0892104	0,0202751
88	0,9418509	0,2968878	9,5	6,952294	0,045908	0,001	0,0034	0,0217827	0,0740612

RESULTADOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 5

Tempo (h)	ART (g/L)	AR (g/L)	pH	CC (g/L)	PS (g/L)	A β-CD (U/mL0)	A γ-CD (U/mL)	A.E β-CD (U/mg0)	A.E γ-CD (U/mg)
0	15,730838	3,3681409	10,23	0,5827905	0,0314504	0,0006	0,0046	0	0
4	15,151515	3,3190008	10,21	0,6246664	0,03386	0,0062	0	0,0190777	0,1462621
8	14,26025	3,1613432	10,15	0,629593	0,0605664	0,0018	0	0,1831069	0
20	11,898396	2,1498771	9,74	1,41191	0,1095616	0,0208	0	0,0297194	0
28	11,27451	1,7874693	9,83	1,4661024	0,0858672	0,0154	0	0,1898475	0
32	11,096257	1,6216216	9,82	1,8060364	0,1083568	0,024	0	0,1793467	0
44	10,383244	1,1588862	10,02	0,8798393	0,1189992	0,0224	0,0038	0,2214905	0
52	9,2691622	1,0790336	10,01	0,8552064	0,1135776	0,0274	0	0,1882366	0,031933
56	8,5561497	1,0687961	10,02	0,919252	0,131248	0,0272	0,0008	0,2412448	0
76	6,1051693	0,8210483	9,84	0,6581432	0,1258264	0,036	0,0074	0,2072413	0,0060953
80	6,0606061	0,7555283	9,88	0,6236572	0,0814496	0,0522	0,0192	0,2861085	0,0588112
94	4,6791444	0,7227682	9,87	1,1015354	0,0764296	0,0628	0,0132	0,6408871	0,1178643
103	3,7878788	0,6490581	9,98	1,3872771	0,0563496	0,0738	0,0274	0,8216712	0,086354
120,5	2,8520499	0,6060606	10,01	1,1803607	0,0384784	0,0692	0,0134	1,309681	0,2431251
124	2,4064171	0,5814906	10,05	0,9931507	0,0487192	0,0716	0,004	1,7984116	0,1741237
137	2,1836007	0,045045	10,02	0,8700374	0,0373427	0,0593	0,0032	1,4696465	0,0410516

RESULTADOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 6

Tempo (h)	ART (g/L)	AR (g/L)	pH	CC (g/L)	PS (g/L)	A β-CD (U/mL0)	A γ-CD (U/mL)	A.E β-CD (U/mg0)	A.E γ-CD (U/mg)
0	18,048128	4,7993448	10,28	0,1073755	0,0402856	0,0032	0	0,0794328	0
3	13,792335	4,6150696	10,17	0,1862008	0,0597632	0,0056	0,0042	0,0937031	0,0702774
8	12,990196	4,0663391	9,75	0,9867701	0,0714096	0,015	0	0,2100558	0
20	12,5	3,8533989	9,49	2,0425122	0,0270328	0,028	0,0128	1,0357788	0,4734989
26	9,157754	3,1961507	9,57	2,2888412	0,0320528	0,0358	0,0256	1,1169071	0,7986822
30	7,9991087	2,9095004	9,69	2,3331804	0,0465104	0,0246	0,0176	0,528914	0,37841
42	7,8654189	2,3423423	9,48	0,9783709	0,0742208	0,029	0,0078	0,390726	0,1050918
51	7,2860963	2,1253071	9,82	0,7960875	0,0764296	0,046	0,0136	0,6018611	0,1779415
54	7,1746881	2,0290745	9,81	0,766528	0,0896824	0,0428	0,0274	0,4772397	0,3055226
67	6,0160428	1,7649468	9,43	1,3478644	0,0424944	0,0454	0,022	1,0683761	0,5177153
74	5,4144385	1,5315315	9,45	1,5547808	0,04892	0,051	0,0366	1,0425184	0,7481603
78	5,1470588	1,4025389	9,44	1,6533124	0,04892	0,0578	0,0272	1,1815209	0,5560098
98	3,4536542	0,9090909	9,46	1,4562492	0,0441008	0,0586	0,0214	1,3287741	0,485252
122	2,2727273	0,7780508	9,49	1,7272111	0,0404864	0,0686	0,0154	1,6943961	0,3803746

RESULTADOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 7

Tempo (h)	ART (g/L)	AR (g/L)	pH	CC (g/L)	PS (g/L)	A β-CD (U/mL0)	A γ-CD (U/mL)	A.E β-CD (U/mg0)	A.E γ-CD (U/mg)
0	21,951872	5,5004456	10,48	0,060573	0,0872728	0,0016	0,0196	0,0183333	0,2245831
4	20,43672	5,3177362	10,46	0,0679629	0,0828552	0,0036	0,019	0,0434493	0,2293157
13	17,71836	5,1194296	9,96	2,0607645	0,0906864	0,013	0,0754	0,1433512	0,8314367
21	17,361854	4,1836007	9,47	2,6386284	0,1007264	0,0252	0,0306	0,2501827	0,3037932
25	14,643494	3,7134581	9,5	2,6878942	0,0808472	0,0286	0,011	0,3537537	0,1360591
38	12,816399	3,1942959	9,75	2,7223803	0,115184	0,0288	0,0154	0,2500347	0,1336991
45	12,727273	2,1426025	9,85	2,0671451	0,0896824	0,042	0,055	0,4683193	0,6132753
49	12,370766	2,0356506	9,87	1,8257427	0,1093608	0,0214	0,0176	0,1956825	0,1609352
64	10,409982	1,8395722	9,96	1,5695605	0,1348624	0,0248	0,0126	0,1838911	0,0934286
69	10,320856	1,7838681	9,86	1,998173	0,1280352	0,0222	0,0256	0,1733898	0,199945
72,5	7,6470588	1,4407308	9,66	2,3430336	0,1268304	0,0244	0,007	0,1923829	0,0551918
93	4,7950089	1,0864528	9,44	3,8111544	0,1103648	0,039	0,0174	0,3533735	0,157659
97	4,7504456	0,872549	9,37	3,4416609	0,1206056	0,0342	0,0422	0,2835689	0,3499008
97,1	13,083779	2,9157754	9,17	1,9587604	0,1579544	0,0394	0,044	0,2494391	0,2785614
110	5,9536542	2,4656863	8,31	3,9983645	0,086068	0,0256	0,0238	0,2974392	0,2765255
113,5	4,3493761	2,2005348	8,05	4,6338933	0,0886784	0,0228	0,022	0,2571088	0,2480875
123	3,85918	1,6590909	11	3,3776154	0,0834576	0,0014	0,0126	0,016775	0,1509749
137	3,4135472	1,592246	10,8	3,2051851	0,0798432	0,0064	0,0082	0,0801571	0,1027013
141	2,8787879	1,2736185	10,32	3,6485773	0,0663896	0,001	0,0112	0,0150626	0,1687011
153,5	2,1657754	0,5271836	9,28	4,1461619	0,1045416	0,0012	0,0056	0,0114787	0,0535672
161	1,942959	0,5093583	9,47	4,3481517	0,090084	0,003	0,082	0,0333023	0,9102615
165	1,7201426	0,4959893	9,51	4,9836805	0,0898832	0,008	0,2664	0,0890044	2,9638464
178,5	1,5864528	0,4893048	9,67	5,4122929	0,0862688	0,0006	0,0368	0,006955	0,4265737
185	1,5418895	0,4714795	9,48	4,2545466	0,0928952	0,0018	0,0158	0,0193767	0,1700841
189	1,3636364	0,4826203	9,56	4,9048552	0,0908872	0,001	0,015	0,0110026	0,1650397
202,5	1,2745098	0,4714795	9,93	5,5305309	0,0611688	0,0012	0,0074	0,0196178	0,1209767
209	1,1853832	0,368984	9,99	5,3482474	0,0561488	0,0008	0,0308	0,0142479	0,5485424
209,1	14,286988	4,1590909	10,22	2,5992158	0,0567512	0,001	0,006	0,0176208	0,1057246
213	9,2067736	4,1100713	9,79	2,5893626	0,0641808	0,001	0,0122	0,015581	0,190088
225	9,1176471	4,0187166	9,69	2,7470132	0,0732168	0,0048	0,0216	0,0655587	0,2950143
233	8,3600713	3,6956328	9,67	2,3528868	0,0774336	0,0024	0,007	0,0309943	0,0904
241,5	8,2709447	3,2254902	9,63	2,3676665	0,081048	0,0028	0,013	0,0345474	0,1603988
259	7,6024955	2,8355615	9,65	2,6583347	0,0828552	0,0028	0,0084	0,0337939	0,1013817
259,1	12,950089	5,5695187	10,01	1,5547808	0,108156	0,0046	0,0074	0,0425312	0,0684197
281	5,1960784	2,5525847	9,02	3,4712204	0,0547432	0,0034	0,0094	0,0621082	0,1717108
285	4,0819964	1,9309269	8,81	3,4367344	0,0483176	0,003	0,0028	0,0620892	0,0579499
304	2,0320856	0,8012478	9,28	5,2743487	0,0565504	0,0012	0,0072	0,02122	0,1273201
308	1,3636364	0,7678253	9,29	5,8113459	0,0637792	0,0004	0,0068	0,0062716	0,1066178
322	1,3190731	0,6296791	9,67	6,2350318	0,0517312	0,0008	0,018	0,0154646	0,3479525
328	1,1853832	0,6029412	9,72	5,7128143	0,0533376	0,0014	0,0114	0,0262479	0,2137329

RESULTADOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 8

Tempo (h)	ART (g/L)	AR (g/L)	pH	CC (g/L)	PS (g/L)	A β -CD (U/mL0)	A γ -CD (U/mL)	A.E β -CD (U/mg0)	A.E γ -CD (U/mg)
0	17,736185	3,8226863	10,66	0	0,0732168	0,0016	0,0146	0,0218529	0,1994078
8	17,602496	3,7940213	10,6	0,02	0,0657872	0,0014	0,0228	0,0212807	0,346572
20	16,800357	3,6322686	10,04	0,6837854	0,0685984	0,0014	0,029	0,0204086	0,4227504
28	15,508021	2,7293202	9,64	2,0533746	0,0651848	0,0076	0,0166	0,1165916	0,2546606
32	15,196078	2,2891073	9,64	2,1804565	0,064984	0,0142	0,0128	0,2185153	0,1969716
44	15,196078	1,8161343	9,79	1,0571962	0,1531352	0,0308	0,0168	0,2011295	0,109707
52	13,72549	1,011466	9,77	1,200067	0,106148	0,0548	0,0474	0,5162603	0,4465463
56	10,784314	1,3902539	9,78	1,6385327	0,1348624	0,07	0,101	0,5190476	0,7489115
68	12,878788	1,0462735	9,58	3,4564407	0,132252	0,0754	0,1586	0,5701237	1,1992257
80	12,210339	1,0974611	9,58	3,7963747	0,1185976	0,0472	0,0664	0,3979844	0,5598764
92	8,1105169	1,5028665	9,53	4,5501414	0,1127744	0,0276	0,084	0,2447364	0,7448499
100	4,8573975	0,8476658	9,46	4,9639742	0,0959072	0,0232	0,0416	0,2419005	0,4337526
104	9,3582888	2,512285	9,48	4,3284453	0,1394808	0,026	0,113	0,1864056	0,8101473
116	6,8181818	0,999181	9,47	4,156015	0,15936	0,0256	0,0148	0,1606426	0,0928715
124	6,1497326	0,8742834	9,48	4,0032911	0,0941	0,0276	0,0104	0,293305	0,1105207
128	4,7237077	0,7821458	9,4	4,0427037	0,1057464	0,0296	0,0052	0,279915	0,0491743
140	5,1693405	1,040131	9,38	4,1510885	0,1135776	0,022	0,0266	0,1937002	0,2342011
148	4,6791444	0,962326	9,38	4,1609416	0,1105656	0,0276	0,0274	0,2496256	0,2478167
152	4,1889483	1,0728911	9,4	4,2643998	0,1264288	0,0256	0,0208	0,2024855	0,1645195
163	3,6541889	1,036036	9,43	3,7323292	0,1063488	0,0224	0,019	0,2106277	0,1786574
172	4,2780749	1,3042588	9,38	4,614187	0,1149832	0,0206	0,021	0,1791566	0,1826354
176	3,9215686	1,1650287	9,43	4,1412353	0,1667896	0,0176	0,0298	0,1055222	0,1786682
188	2,9411765	1,036036	9,13	3,8357873	0,108156	0,0216	0,0978	0,1997115	0,9042494
196	2,6292335	0,9049959	9,23	3,5401925	0,1440992	0,0196	0,0254	0,1360174	0,1762675
200	2,4509804	1,0053235	9,21	3,2396712	0,1501232	0,0236	0,0196	0,1572042	0,1305594
212	3,030303	0,7596233	9,32	4,2299137	0,1330552	0,0092	0,0362	0,0691442	0,2720675
220	2,5846702	0,9418509	9,48	4,402344	0,17442	0,0098	0,068	0,0561862	0,3898635
225	2,5846702	0,978706	9,55	3,9885113	0,1571512	0,0116	0,0318	0,0738143	0,2023529
241	3,4313725	0,9049959	9,59	4,402344	0,12422	0,0116	0,0254	0,0933827	0,2044759
249	3,1639929	0,8190008	9,59	4,2052808	0,1629744	0,0092	0,0276	0,0564506	0,1693518
266	2,9857398	0,5630631	9,48	3,2544509	0,1710064	0,0102	0,0368	0,0596469	0,2151966
271,5	1,5508021	2,4856675	9,17	3,8456405	0,1585568	0,0112	0,0368	0,0706371	0,2320935
290	2,9857398	1,3738739	9,21	4,6683794	0,1732152	0,0098	0,022	0,056577	0,1270096
296	2,5846702	1,1199836	9,43	4,3826377	0,1716088	0,0084	0,0168	0,0489485	0,0978971
315	2,5846702	1,0954136	9,48	4,0229974	0,18446	0,0084	0,027	0,0455383	0,1463732
323	2,4509804	1,0831286	9,56	4,2693264	0,1607656	0,0092	0,0368	0,0572262	0,2289047
337	2,4509804	1,0708436	9,56	4,2939593	0,1465088	0,0088	0,043	0,0600647	0,2934977
342	2,228164	1,0544636	9,01	4,2446935	0,1595608	0,0092	0,0184	0,0576583	0,1153165
361	3,5204991	1,4823915	9,03	4,6979388	0,1565488	0,0102	0,044	0,0651554	0,2810625
364,5	2,228164	1,2366912	9,29	4,7915439	0,155344	0,0098	0,0214	0,0630858	0,1377588

384	2,228164	1,1650287	9,34	4,954121	0,171408	0,0064	0,0538	0,0373378	0,313871
390	2,1836007	1,1036036	9,48	5,2644955	0,1740184	0,007	0,0188	0,0402256	0,1080346
409	1,8270945	1,0810811	9,48	4,8802223	0,1830544	0,0066	0,1058	0,0360549	0,5779703

RESULTADOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 9

Tempo (h)	ART (g/L)	AR (g/L)	pH	CC (g/L)	PS (g/L)	A β -CD (U/mL0)	A γ -CD (U/mL)	A.E β -CD (U/mg0)	A.E γ -CD (U/mg)
0	18,627451	5,5917281	10,51	0,0039173	0,1240192	0,0008	0,011	0,0064506	0,0886959
4	16,800357	4,3734644	10,58	0,0285502	0,0764296	0,001	0,0106	0,0130839	0,1386897
8	16,488414	4,037674	10,46	0,0654996	0,0912888	0,0012	0,0032	0,0131451	0,0350536
20	12,076649	3,1797707	9,43	1,6188263	0,1290392	0,0078	0,0096	0,0604467	0,074396
28	11,987522	1,981982	9,26	2,431712	0,1471112	0,0216	0,0162	0,1468277	0,1101208
32	11,452763	1,7424242	9,28	2,8652511	0,140284	0,0244	0,0296	0,1739329	0,2110005
44	9,1354724	1,1977887	9,5	2,091778	0,1649824	0,0246	0,022	0,1491068	0,1333476
52	8,8680927	1,0524161	9,55	1,8700819	0,1766288	0,0286	0,0184	0,1619215	0,1041733
56	8,4224599	0,9520885	9,44	2,150897	0,1605648	0,0284	0,025	0,1768756	0,1557004
68	6,8627451	0,9234234	9,39	2,2050894	0,1330552	0,034	0,0252	0,255533	0,1893951
76	4,8573975	0,8906634	9,37	2,4760513	0,1316496	0,0378	0,0178	0,2871258	0,1352074
80	4,7237077	0,8804259	9,3	2,5351702	0,135264	0,0388	0,0234	0,2868465	0,172995
80,1	8,1996435	1,459869	9,24	1,9883198	0,1204048	0,0288	0,0224	0,2391931	0,1860391
92	4,456328	1,3984439	8,55	2,2395754	0,078036	0,0256	0,0104	0,3280537	0,1332718
100	4,144385	1,3554464	8,82	1,1951405	0,0563496	0,0214	0,0226	0,379772	0,4010676
104	3,4313725	1,3165438	8,86	1,5892669	0,0973128	0,022	0,018	0,2260751	0,1849705
116	2,7183601	1,1670762	9	2,2789881	0,0457072	0,0276	0,0092	0,6038436	0,2012812
124	2,228164	0,8599509	9,07	2,8455448	0,0661888	0,0214	0,0226	0,3233175	0,3414475
124,1	4,456328	2,0167895	9,08	2,3873728	0,0836584	0,028	0,009	0,3346944	0,1075804
128	4,0552585	1,8263718	8,62	3,4515141	0,1143808	0,0238	0,0126	0,2080769	0,1101583
140	1,3814617	0,7473382	8,27	5,0378729	0,0947024	0,0314	0,0202	0,331565	0,2132998
148	1,2477718	0,6142506	8,72	5,1511842	0,1561472	0,0394	0,0284	0,252326	0,1818797
152	1,114082	0,5876331	8,83	5,4812651	0,1145816	0,041	0,021	0,3578236	0,1832755
172	1,0249554	0,2948403	9,17	4,8654426	0,0555464	0,0466	0,0114	0,8389383	0,2052338
172,1	3,1194296	2,1355446	9,15	4,6535996	0,0533376	0,0328	0,0128	0,6149508	0,2399808
176	3,0748663	1,973792	8,92	4,6979388	0,07402	0,0302	0,0094	0,4079978	0,1269927
188	2,8966132	1,5397215	8,92	6,2399584	0,0965096	0,0332	0,0078	0,3440072	0,080821
196	2,6737968	1,0872236	8,97	7,3484389	0,0816504	0,0266	0,0128	0,3257792	0,1567659
200	2,3618538	0,9009009	9,03	7,6144742	0,1394808	0,0266	0,0172	0,1907073	0,1233145
220	2,3172906	1,6605242	9,12	7,7671982	0,1348624	0,0232	0,0148	0,1720272	0,1097415
220,1	8,1105169	1,6277641	9,18	6,7917353	0,067996	0,0134	0,014	0,1970704	0,2058945
226	8,0213904	1,484439	9,1	6,2153255	0,0653856	0,0096	0,0196	0,1468213	0,2997602
240	7,8877005	1,455774	9,28	5,998556	0,0623736	0,0074	0,0152	0,1186399	0,2436928
248	7,798574	1,4148239	9,23	5,939437	0,069	0,014	0,0208	0,2028986	0,3014493
255	7,7540107	1,2674038	9,33	5,8901712	0,065988	0,024	0,0052	0,3637025	0,0788022
272	7,6648841	1,1834562	9,31	5,939437	0,0561488	0,014	0,0458	0,2493375	0,8156897
276	7,0855615	1,1814087	9,31	6,3828292	0,0611688	0,0174	0,0076	0,2844587	0,1242463
288	6,1942959	1,0892711	9,28	6,4123887	0,0563496	0,0308	0,0122	0,5465877	0,2165055

292	5,7486631	1,0790336	9,29	6,2892242	0,0965096	0,0128	0,015	0,1326293	0,155425
296	5,7040998	1,0565111	9,29	5,9000244	0,055948	0,0202	0,0162	0,3610495	0,2895546
300	5,3475936	0,990991	9,3	6,3532697	0,0531368	0,017	0,0346	0,3199289	0,6511495
312	4,7682709	0,982801	9,15	6,2596647	0,0507272	0,013	0,0086	0,2562728	0,1695343
316	4,5454545	0,9684685	9,21	6,6143785	0,0483176	0,0316	0,0248	0,654006	0,5132705
316,1	15,329768	3,2452907	9,05	6,0084091	0,0473136	0,0222	0,0154	0,4692097	0,3254878
320	15,017825	3,2411957	9,15	5,7817864	0,0525344	0,014	0,0144	0,2664921	0,2741061
324	13,190731	3,2063882	9,14	5,5206777	0,0439	0,0098	0,0116	0,2232346	0,2642369
336	13,057041	3,1408681	9,08	5,4221461	0,0571528	0,0222	0,0264	0,3884324	0,4619196
346	9,1354724	3,1265356	9,3	5,5650169	0,0597632	0,0188	0,0166	0,3145749	0,2777629
362	6,1051693	2,7149877	9,32	5,9936294	0,0483176	0,0338	0,014	0,6995381	0,2897495
