



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
Departamento de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



VANDERSON CARVALHO FENELON

**PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS EM SISTEMAS DE
ULTRAFILTRAÇÃO PELA CGTase DE *Bacillus firmus* CEPA
37 LIVRE E IMOBILIZADA EM SUPORTES NATURAIS.**

MARINGÁ

2018

VANDERSON CARVALHO FENELON

**Produção de Ciclodextrinas em Sistemas de Ultrafiltração pela
CGTase de *Bacillus firmus* Cepa 37 Livre e Imobilizada em
Suportes Naturais.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. ^a Dr. ^a Graciette Matioli

MARINGÁ

2018

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

F332p

Fenelon, Vanderson Carvalho

Produção de ciclodextrinas em sistemas de ultrafiltração pela CGTase de *Bacillus firmus* cepa 37 livre e imobilizada em suportes naturais / Vanderson Carvalho Fenelon. -- Maringá, 2018. 50 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Graciette Matioli.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.

1. Ciclomaltodextrina glucanotransferase - Suportes naturais - Imobilização. 2. *Bacillus firmus* cepa 37. 3. Enzima CGTase - Produção contínua. 4. Enzima CGTase - Batelada repetitiva - Glicirrizina. I. Matioli, Graciette, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 21.ed. 660.634

Mariza Nogami - CRB 9/1569

VANDERSON CARVALHO FENELON

**PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS EM SISTEMAS DE
ULTRAFILTRAÇÃO PELA CGTASE DE *BACILLUS FIRMUS* CEPA 37
LIVRE E IMOBILIZADA EM SUPORTES NATURAIS.**

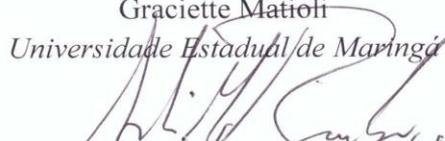
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 06 de abril de 2018

BANCA EXAMINADORA



Graciete Matioli
Universidade Estadual de Maringá



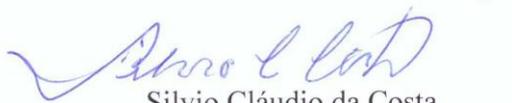
Aneli de Melo Barbosa Dekker
Universidade Estadual de Londrina



Daniel Tait Vareschini
Universidade Estadual de Maringá



Gisella Maria Zanin
Universidade Estadual de Maringá



Silvio Cláudio da Costa
Universidade Estadual de Maringá

AGRADECIMENTOS

Manifesto aqui a minha mais sincera gratidão a Deus e às pessoas que tornaram a concretização deste trabalho possível. Sozinho, nada se cria! Como diria a frase que comumente se atribui a Yokoyama Ono e John Lennon, “Um sonho que se sonha sozinho é só um sonho, mas um sonho que se sonha junto é realidade”. Mais tarde, essa frase inspiradora também comporia a canção Prelúdio, de Raul Seixas. Agradeço à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Graciete Matioli, pela orientação, incentivo, confiança, amizade e por não medir esforços para que esta pesquisa fosse possível. Agradeço à minha família pelo amor, incentivo e compreensão, principalmente quando as coisas se tornam mais difíceis. À minha irmã, Vanessa, pelos conselhos, conversas de profundidade incomparável e pelas maravilhosas ilustrações que enriqueceram este trabalho. A Thiago L. de Almeida pela amizade, apoio e companhia incondicionais. À Camila S. Mangolim e à Juliana H. Miyoshi pela “amizade científica” que começou no Laboratório de Biotecnologia Enzimática (LaBE) e que dá todos os indícios de que não terminará nunca. Agradeço a todos os demais amigos do LaBE que sempre contribuíram para que o trabalho fosse mais leve e descontraído (como deve ser!): Luciana N. Koga, Antonina P. Francisco (Dona Nina), Suelen P. Ruiz, Sóstenes R. Valentini, Carolina P. Francisco, Aline S. Noce, Thamara T. Silva, Hâmara M. de Souza, Maria Fernanda A. Aguiar, Cecília V. R. Truite, Gabriela G. Gimenez, Tiele Delani, Nathália M. Valério, Paula Vitória, Richard M. Silva, Isadora Rosa, Virgínia M. F. Santos, Mariana O. Silva, Juliana Castro. Agradeço aos amigos farmacêuticos Milena O. Jayme, Jaqueline H. Adati, Juliana Cerquetani, Vanessa Kaplum e Juliana Barbosa pelo companheirismo que se mantém mesmo à distância.

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PCF), que me deram a oportunidade de uma excelente formação acadêmica, em uma jornada que se iniciou em 2007. Agradeço à Francisca Helena M. de Carvalho pela sua dedicação na secretaria do PCF, nos dando atenção e assistência em diversas situações.

Por fim, agradeço ao CNPq e à CAPES pela concessão das bolsas de estudo que possibilitaram a minha dedicação integral a esta pesquisa. E, mais uma vez, ao CNPq, à CAPES e também à Fundação Araucária pelo apoio financeiro que possibilitou a infraestrutura utilizada para a execução da pesquisa.

[...]

Se eu sou algo incompreensível,

Meu Deus é mais.

Mistério sempre há de pintar por aí...

Esotérico (GILBERTO GIL, 1982)

RESUMO

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos obtidos a partir do amido por meio de uma reação de transglicosilação molecular catalisada pela enzima ciclomaltodextrina glucanotransferase (CGTase). As principais CDs são denominadas α -, β - e γ -CD e possuem, respectivamente, 6, 7 e 8 unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4. As propriedades físico-químicas das CDs as tornam capazes de formar complexos de inclusão com diversas outras moléculas, proporcionando, por exemplo, melhor solubilidade e estabilidade, bem como gerando uma série de aplicações tecnológicas e industriais. Avaliou-se comparativamente diferentes modelos estratégicos de produção de CDs a partir da CGTase de *Bacillus firmus* cepa 37: produção contínua e bateladas repetitivas em sistemas de ultrafiltração; imobilização da CGTase nos suportes naturais curdlana e esponja vegetal; e a utilização do agente complexante glicirrizina para modular a seletividade da CGTase em favor da produção de γ -CD. Todas as estratégias tiveram em comum a possibilidade de separação da CGTase dos seus produtos inibitórios e a sua reutilização. No modelo de produção contínua, em 48 h de ensaio, as maiores produtividade e seletividade para β -CD foram obtidas, 1,47 mmol/L/h e 92,84%, respectivamente. Em seguida, a produtividade do modelo de bateladas repetitivas seguidas de ultrafiltração alcançou 0,88 mmol/L/h e seletividade semelhante à do modelo contínuo. A glicirrizina foi capaz de modular a produção da γ -CD com seletividade de 61,21% para bateladas de 30 h. Baixas produtividades foram observadas para as bateladas repetitivas com a CGTase imobilizada em curdlana (0,32 mmol/L/h) e em esponja vegetal (0,03 mmol/L/h), o que pode estar relacionado com uma inativação parcial da enzima durante o processo de imobilização. A avaliação comparativa dos diferentes modelos estratégicos para obtenção de CDs mostrou particularidades que devem ser consideradas, e a maioria dos modelos estudados proporcionou rendimentos satisfatórios, bem como excelentes seletividades.

ABSTRACT

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides obtained from the starch by means of a molecular transglycosylation reaction catalyzed by the enzyme cyclomalto-dextrin glucanotransferase (CGTase). The main CDs are called α -, β - and γ -CD and have, respectively, 6, 7 and 8 glucose units joined by α -1,4 glycosidic bonds. The physical-chemical properties of the CDs make them capable of forming inclusion complexes with several other molecules, providing, for example, better solubility and stability, as well as generating a series of technological and industrial applications. Diverse strategic models of CDs production by the CGTase from *Bacillus firmus* strain 37 were comparatively evaluated: continuous production and repetitive batches in ultrafiltration systems; immobilization of CGTase on curdlan and vegetable sponge natural supports; and the use of the glycyrrhizin complexing agent to modulate CGTase selectivity in favor of γ -CD production. All strategies had in common the possibility of separation of CGTase from its inhibitory products and its reuse. In the continuous production model, at 48 h of assay, the highest productivity and selectivity for β -CD were obtained, 1.47 mmol/L/h and 92.84%, respectively. Then, the productivity of the repetitive batches model in ultrafiltration system reached 0.88 mmol/L/h and selectivity quite similar to that of the continuous model. Glycyrrhizin was able to modulate the production of γ -CD with selectivity of 61.21% for 30-h batches. Low productivities were observed for the repetitive batches with CGTase immobilized in curdlan (0.32 mmol/L/h) and vegetable sponge (0.03 mmol/L/h), which may be related to a partial inactivation of the enzyme during the immobilization process. The comparative evaluation of the different strategic models for obtaining CDs showed particularities that should be considered, and most of the models studied returned satisfactory yields as well as excellent selectivities.

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA _____	8
	REFERÊNCIAS _____	19
2	ARTIGO CIENTÍFICO _____	23
2.1	Introdução _____	24
2.2	Materiais e métodos _____	26
2.3	Resultados e discussão _____	33
2.4	Conclusão _____	47
	Agradecimentos _____	47
	Referências _____	47

1 REVISÃO DE LITERATURA

As ciclodextrinas (CDs), também denominadas dextrinas de Schardinger, cicloamilose ou ciclomaltose são uma família de oligossacarídeos cíclicos, não redutores, nos quais as unidades de glicose estão unidas por ligações α -1,4, sendo que as estruturas mais comuns são constituídas por 6, 7 ou 8 unidades, denominadas de α -CD (ciclohexaamilose), β -CD (cicloheptaamilose) ou γ -CD (ciclooctaamilose), respectivamente (Figura 1) (DEL VALLE, 2004; SINGH et al., 2002; SZEJTLI, 1997).

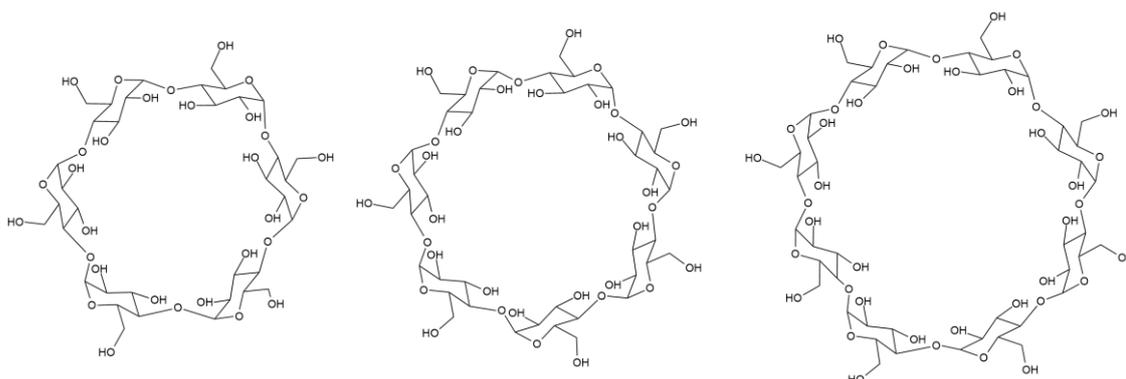


Figura 1. Fórmulas estruturais representando as moléculas das principais CDs. Da esquerda para a direita: α -CD, β -CD e γ -CD, respectivamente.

Elas são produzidas a partir da reação de ciclização do amido catalisada pela enzima ciclomaltodextrina glucanotransferase (CGTase). Esta enzima é membro da família glicosilases amilolíticas (VAN DER VEEN, 2000). É uma enzima extracelular, produzida por vários micro-organismos pertencentes ao gênero *Bacillus* como *Bacillus firmus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus macerans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus lentus*, *Thermoanaerobacter* sp., outros como *Klebsiela oxytoca*, *Micrococcus* spp. (ARYA e SRIVASTAVA, 2006; MATIOLI et al., 1998; MATIOLI et al., 2001; MATIOLI et al., 2002; SZERMAN et al., 2007; TARDIOLI et al., 2006). A maioria das CGTases bacterianas produzem uma mistura composta principalmente por α -CD, β -CD e uma pequena quantidade de γ -CD (TONKOVA, 1998).

A CGTase é uma enzima monomérica, com massa molecular da ordem de 74,5 kDa. Sua sequência de aminoácidos revela uma similaridade estrutural com a enzima α -amilase. As CDs são formadas por meio de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular, ou ciclização. Porém, as CGTases também possuem atividade em reações de transglicosilação intermolecular (acoplamento e desproporcionamento) e, em menor escala em reações de

hidrólise do amido (VETTER e THORN, 1992). Em suma, a CGTase é uma enzima complexa que catalisa quatro tipos de reações: ciclização, acoplamento, desproporcionamento e hidrólise (Figura 2) (MATIOLI et al., 2000; VASSILEVA et al., 2005).

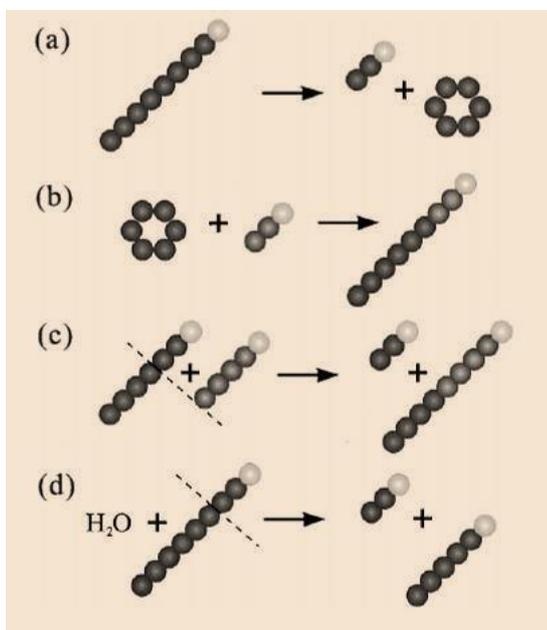


Figura 2. Representação esquemática das reações catalisadas pela CGTase. a) ciclização; b) acoplamento; c) desproporcionamento; d) hidrólise. Fonte: Adaptado de PINTO et al., 2007. As esferas representam resíduos de glicose, e os círculos claros indicam os finais redutores dos açúcares.

As CDs são formadas pela reação de ciclização ou transglicosilação intramolecular. Nesta reação, o substrato deve conter acima de seis unidades de glicose, e ainda estar na sua forma helicoidal (BENDER, 1986; MATIOLI et al., 2000). A reação de ciclização normalmente produz uma mistura de CDs (α , β e/ou γ -CD), cuja proporção pode variar dependendo da origem da CGTase, do tempo e das condições de reação (GOH et al., 2009; WANG et al., 2006; ALVES-PRADO et al., 2008).

A reação inversa à ciclização é a de acoplamento, ou seja, o anel da CD é clivado e transferido para um substrato aceptor linear (maltooligossacarídeo). Essa reação confere caráter reversível à produção de CDs, pois, uma vez formadas, podem se ligar novamente à enzima e dar origem a dextrinas lineares. Já na reação de desproporcionamento, um maltooligossacarídeo linear é clivado e o novo maltooligossacarídeo com final redutor é transferido para um substrato aceptor. Por fim, a reação de hidrólise caracteriza-se pela quebra das ligações α -1,4-glicosídicas, mas ocorre a uma velocidade muito baixa (DESOUZA et al., 2013; VAN DER VEEN et al., 2000; PINTO et al., 2007).

Graças à natureza hidrofóbica da sua cavidade, as CDs apresentam grande habilidade em encapsular uma larga faixa de moléculas orgânicas e inorgânicas, com tamanho, forma e hidrofobicidade adequada, interagindo com estas de forma não covalente, para formar um complexo estável, por inclusão molecular. Os complexos de inclusão modificam as propriedades físico-químicas da molécula hóspede, aumentando consideravelmente sua estabilidade e solubilidade. A presença de grupos hidroxilas livres na superfície da CD permite sua interação com a água por ligações de hidrogênio, proporcionando aos complexos grande solubilidade nos líquidos polares. Estas características permitem que as CDs, ou seus derivados, sejam adequados para aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética, têxtil, química entre outras (DEL VALLE, 2004; BREWSTER e LOFTSSON, 2007; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007; SZENTE e SZEJTLI, 2004).

É bastante reconhecida a importância das CDs no aumento da biodisponibilidade de fármacos. A solubilidade de um fármaco e seu comportamento em água é uma característica importante, considerando que a água é o principal constituinte dos tecidos. Assim, a facilidade com que uma substância atravessa as membranas celulares e o transporte de um fármaco desde o local de administração até o seu sítio de ação é altamente influenciado pela sua solubilidade e sua ionização na água, bem como pelo coeficiente de partição do fármaco entre a água e lipídios. A dissolução é um fator limitante para a absorção de substâncias ativas pouco solúveis em água. A complexação de fármacos com as CDs pode propiciar, além de maior estabilidade química, um acréscimo da solubilidade em água, aumentando expressivamente sua biodisponibilidade (MELO et al., 2007).

Segundo Kurkov e Loftsson (2013), várias publicações relatam listas completas de produtos farmacêuticos contendo CDs, que foram aprovados com sucesso por agências reguladoras nos Estados Unidos, União Européia e Japão. No Brasil, os medicamentos com registros aprovados e vigentes contendo CDs são: CICLADOL, BREXIN, FLOGENE (piroxicam complexado com β -CD) e MAXSULID (nimesulida complexada com β -CD). Os alimentos contendo CDs devem ser registrados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e enquadram-se na categoria de novos alimentos e novos ingredientes, devendo passar por avaliação de segurança (BRASIL, 2016).

Derivados de CDs, quimicamente modificados, têm sido sintetizados a fim de melhorar suas propriedades e, mais especificamente, sua atividade farmacológica. Entre esses, os derivados anfifílicos foram concebidos para construir estruturas moleculares organizadas, por meio de sistemas de automontagem ou por incorporação em membranas lipídicas, com o

objetivo de melhorar a vetorização no organismo das CDs contendo fármacos em sua cavidade. Esses derivados podem formar uma variedade de estruturas supramoleculares, como micelas, vesículas e nanopartículas. Além de aumentar as interações das CDs com membranas biológicas e promover a melhora da interação das CDs com as drogas hidrofóbicas, a principal vantagem das CDs anfifílicas são as suas propriedades de auto-montagem, que são suficientes para formar espontaneamente diferentes veículos nanométricos, sem a presença de surfactantes. Suas propriedades únicas podem melhorar a capacidade de carrear os fármacos, a interação celular e a penetração tumoral, os perfis de liberação do fármaco e a citotoxicidade dos sistemas de liberação de fármacos (Varan et al., 2017).

As CDs também têm se destacado para administração de drogas esteroidais, que normalmente é dificultada pelas solubilidades muito baixas na água. A β -CD e seus derivados podem solubilizar esteróides e melhorar a biodisponibilidade destes agentes terapêuticos hidrofóbicos. São relatadas melhorias de solubilidade alcançadas para testosterona, estradiol, progesterona, hidrocortisona, prednisona, dexametasona e finasterida. Além do ajuste espacial do esteróide dentro da cavidade da CD, também os substituintes hidrofílicos na estrutura da CD desempenham um papel importante na extensão da solubilização observada. O derivado heptakis-6-sulfoetilsulfanil-6-desoxi- β -CD aniônica uniformemente substituída (HSES) tem apresentado ótimo desempenho, atingindo eficiências de complexação de 60 a 90% para a maioria dos esteróides. Dois tioéteres neutros β -CD, heptaquis-6-metilsulfanil-6-desoxi-2-(2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)]- β -CD (HTMT) e heptaquis-6-tiogliceril-6-deoxi- β -CD (HTG) mostraram seletividade de gênero na ligação de hormônios: HTMT foi seletiva para testosterona, enquanto HTG foi seletiva para estradiol (SCHWARZ et al., 2017).

Os compostos naturais têm atraído grande atenção devido à sua ampla propriedade terapêutica, com especificidade em sua ação na saúde humana. Podem ser apresentados como alimentos funcionais, fitoterápicos e nutracêuticos. No entanto, a baixa biodisponibilidade e a bioatividade reduzida, atribuída à fraca solubilidade e instabilidade, é a principal desvantagem que impede a incorporação destas moléculas potencialmente terapêuticas em novos sistemas de distribuição de fármacos. Várias pesquisas têm relatado a complexação de fitoquímicos fracamente solúveis em água com CDs, sendo uma abordagem promissora para melhorar, além da sua solubilidade em água, também a estabilidade, a taxa de dissolução e a biodisponibilidade, que são fatores intimamente relacionados. A encapsulação abrange distintos compostos naturais, que vão desde vários flavonóides, derivados fenólicos, cumestanos e triterpenos, que podem ser complexados com CDs ou seus derivados. Vários

artigos e patentes têm descrito melhoria na estabilidade e solubilidade da curcumina, empregando, por exemplo, a complexação com derivado de éter alquílico de γ -CD. A complexação de artemisininas com β -CD melhorou a estabilidade e integridade da parte peróxido das artemisininas por longo período. Por outro lado, o complexo de dihidromiricetina com γ -CD mostrou solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade melhoradas. Assim, fitoquímicos com múltiplas atividades biológicas e com índice de segurança amplo têm tido a sua solubilidade melhorada, o que é de suma importância para a sua efetiva utilização com finalidades terapêuticas (SUVARNA et al., 2017).

As CDs estão cada vez mais presentes como constituintes invisíveis de produtos comuns e de uso diário como cosméticos e de higiene pessoal, têxteis, alimentares, excipientes em vários produtos médicos e farmacêuticos, e muitos outros. Em 1970, o quilograma de β -CD era vendido a um preço de 2 mil dólares e, em 2007, a sua produção mundial foi de aproximadamente 10.000 toneladas, com preço médio de 5 dólares por quilograma de β -CD (BREWSTER e LOFTSSON, 2007; KURKOV e LOFTSSON, 2013).

Um exemplo interessante do emprego das CDs em tecnologias atuais e inovadoras foi desenvolvido e descrito por Luo et al. (2017). Pontos de carbono são uma nova classe de materiais de carbono que apresentam fluorescência e tem se mostrado promissores para diversas aplicações tecnológicas. Um novo ponto de carbono funcionalizado foi sintetizado ligando covalentemente a β -CD à superfície de pontos de carbono codificados com N, S (β -CD-CDs). A caracterização foi confirmada por microscopia eletrônica de transmissão, espectroscopia de fotoelétrons de raios-X, espectros de infravermelho, ultravioleta-visível e espectros de emissão de fluorescência. Com base neste ponto de carbono e iodeto de (ferrocenilmetil) trimetilamônio (Fc^+), foi desenvolvido um sistema de sonda fluorescente fotoinduzida por elétrons (PET) para determinar a concentração de testosterona em água e identificar a testosterona na célula por imagiologia, como um biomarcador visível. Sob as condições de teste, a intensidade de fluorescência do sistema de sonda respondeu linearmente à concentração de testosterona de 0 $\mu\text{mol/L}$ a 280 $\mu\text{mol/L}$ e o limite de detecção foi de 0,51 $\mu\text{mol/L}$. O sistema de sonda também teve um bom desempenho na determinação de testosterona em águas subterrâneas com recuperação média de testosterona variando de 96% a 107% em níveis de 0,5 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$, e o desvio padrão relativo permaneceu abaixo de 13%, o que forneceu um método confiável, rápido e fácil para determinar a testosterona em água ambiental. Além disso, a baixa citotoxicidade, a alta capacidade de não interferência e a excelente biocompatibilidade dos β -CD-CDs fizeram com que este sistema de sonda fosse

utilizado com sucesso em imagens de fluorescência celular para monitorar os níveis de testosterona no citoplasma de células com um valor de aplicação promissor na pesquisa médica.

As CDs também têm sido utilizadas para a separação enantiomérica de drogas quirais. Mais de 50% dos ingredientes farmacologicamente ativos são opticamente ativos. Embora esses enantiômeros tenham propriedades físicas e químicas idênticas, seus efeitos farmacológicos e toxicológicos são frequentemente significativamente diferentes. O uso de suportes monolíticos contendo CDs ou seus derivados como fases estacionárias quirais tem atraído muita atenção no campo das enantioseparações. Entre os principais tipos de monólitos funcionalizados com CDs, destacam-se os baseados em sílica, em polímero orgânico e híbrido de polímero orgânico e sílica. Diferentes estratégias são utilizadas para a imobilização covalente das CDs em monólitos. Colunas monolíticas funcionalizadas com CDs têm sido aplicadas a uma ampla gama de analitos, de compostos racêmicos ácidos a básicos e neutros em indústrias farmacêuticas, agroquímicas e de alimentos. Várias categorias de compostos ativos são compreendidas, tais como aminoácidos racêmicos, anti-inflamatórios não esteroides, α -hidroxiácidos e derivados, ácidos propiônicos e derivados, bloqueadores dos receptores- β e diidropiridínicos. A maioria desses fármacos racêmicos possui anéis aromáticos, e eles podem facilmente formar complexos de inclusão na cavidade interna das CDs (GUO et al., 2016).

O uso das CDs tem aumentado de 20 a 30% anualmente, contudo, esta porcentagem poderá ser ainda maior com o desenvolvimento de processos biotecnológicos que promovam a redução nos custos e um aumento do rendimento na produção destas moléculas, tais como, imobilização das enzimas ou das bactérias produtoras de CGTases extracelulares. Entre as vantagens da imobilização do microrganismo ou da enzima está a maior facilidade de separação das células do meio de fermentação (ASTRAY et al., 2009; KAREL et al., 1985; MORIWAKI et al., 2007).

Desta forma, vários pesquisadores têm buscado tecnologias inovadoras na produção das CDs, como Gawande e Patkar (2001), que testaram o efeito da concentração de enzima na produção de CDs a partir do amido de trigo (125 g/L) e em presença de 2% (v/v) de butan-1-ol. Conforme esperado, maiores concentrações de enzima levaram a maiores taxas iniciais de produção de CDs. Entretanto, o rendimento final de α -CD (após 6 h) foi quase o mesmo para concentrações entre 20 U/g e 40 U/g de enzima. Embora não seja conhecida a razão para a insensibilidade do rendimento de CDs a concentrações mais elevadas de enzima, são

levantadas duas principais hipóteses. A primeira delas considera que a atividade ciclizante da CGTase pode ser inibida em altas concentrações de produto, o que acarreta uma queda na produção de CDs conforme a sua concentração no meio reacional aumenta. A segunda possibilidade é de que a mistura reacional esteja próxima do equilíbrio final dos experimentos; assim, maiores concentrações de enzima apenas fariam com que o equilíbrio se estabelecesse mais rapidamente.

Outra limitação ao rendimento de CDs está relacionado ao fato de que a atividade de ciclização da CGTase é severamente inibida pelos seus produtos. Este efeito inibitório, chamado inibição do produto, a princípio, é um obstáculo para a produção de CDs em larga escala. Zhekova et al. (2008) testaram os efeitos de produtos, incluindo oligossacarídeos cíclicos e lineares, na atividade de β -ciclização da CGTase e descobriram que a β -CD causou a maior inibição, com um declínio de 80% na atividade, na presença de 10 mg/mL de β -CD.

Kim et al. (1993) produziram CDs a partir de amido de milho triturado e utilizaram um biorreator equipado com uma membrana de ultrafiltração para remoção das CDs produzidas pela CGTase de *Bacillus* sp. BE101. A produção foi conduzida em batelada e por processo contínuo. Para a operação em batelada, o rendimento de CDs foi 57% maior do que aquele observado quando da não utilização da membrana de ultrafiltração. No mesmo estudo foi observado que a estabilidade da CGTase decresceu exponencialmente em 20 h e que apenas 30% da atividade inicial se manteve após 60 h de operação.

Baixo rendimento de CDs tem sido relatado em altas concentrações de amido, bem como uma forte inibição da CGTase pelas CDs produzidas no meio (GAWANDE e PATKAR, 2001). Gastón et al. (2009) demonstraram que as CDs inibiram competitivamente a CGTase do *Bacillus circulans* DF 9R, com um aumento nos valores de velocidade máxima (K_m). Os resultados apontaram que o mais forte inibidor é a γ -CD, seguida pela β -CD e pela α -CD. Também as maltodextrinas tiveram efeito inibitório sobre a atividade da CGTase, sendo a maltose o inibidor mais poderoso. Dessa forma, o rendimento das CDs pode ser melhorado pela remoção de seus produtos inibitórios acumulados na mistura reacional, o que pode ser obtido pelo emprego de um sistema de ultrafiltração acoplado ao reator. Ao mesmo tempo, a separação das CDs já formadas impede a sua destruição pela reversibilidade da reação (acoplamento) (GAWANDE e PATKAR, 2001; GASTÓN et al., 2009).

Também no sentido de melhorar o rendimento, vários estudos têm relatado um incremento na produção de CDs com a presença de etanol no meio reacional (GAWANDE e

PATKAR, 2001; CALSAVARA et al., 2011). Calsavara e colaboradores (2011), trabalhando com a Toruzyme® na presença de etanol 10%, obtiveram um aumento de 18% na produção de β -CD, ao mesmo tempo em que o rendimento de α -CD quase triplicou. Acredita-se que esta propriedade esteja relacionada, primeiramente, com a diminuição da perda de CDs por reações de transglicosilação e acoplamento. Além disso, o etanol diminui a atividade de água na mistura reacional, reduzindo a reação de hidrólise da CGTase (GAWANDE e PATKAR, 2001).

A elevada solubilidade da γ -CD facilita a preparação de soluções mais concentradas de moléculas ativas. Entretanto, α - e β -CD são mais frequentemente produzidas em escala industrial, uma vez que há uma baixa produção de γ -CD por CGTases microbianas. A γ -CD tem a maior cavidade interna e sua solubilidade em água é de 232 g/L (as solubilidades de α -CD e β -CD são 145 g/L e 18,5 g/L, respectivamente), permitindo que ela forme complexos solúveis com moléculas maiores e melhore a solubilidade dessas substâncias. No entanto, até o momento, embora exista uma grande demanda por γ -CD, que é várias vezes mais cara que α -CD e β -CD, sua produção em escala industrial é limitada devido ao baixo rendimento e procedimento caro de purificação. Essas questões técnicas têm restringido o desenvolvimento de aplicações tecnológicas para a γ -CD e fazem com que ele ocupe uma parte consideravelmente menor do mercado (WANG et al., 2013).

Uma das maneiras de alcançar um melhor rendimento da γ -CD é impedir a sua destruição por reações reversíveis que podem ocorrer durante a sua produção. Isto é possível por meio da formação de um complexo estável da γ -CD com uma substância apropriada, como a glicirrizina (MATIOLI et al., 2000). A glicirrizina é uma saponina triterpênica (Figura 3) que ocorre abundantemente em raízes e rizomas de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), sendo seu principal componente ativo. É reconhecida por seu elevado poder edulcorante, sendo de 30 a 200 vezes mais doce que a sacarose. Além disso, também são lhe são atribuídas várias atividades farmacológicas e biológicas, nomeadamente como anticancerígeno, anti-inflamatório, hepatoprotetor, antioxidante e antiviral. Possui aroma específico e intenso, apesar disso, tem sido utilizada tradicionalmente em doces, goma de mascar, creme dental, bebidas e tabaco (CAROCHO et al., 2017).

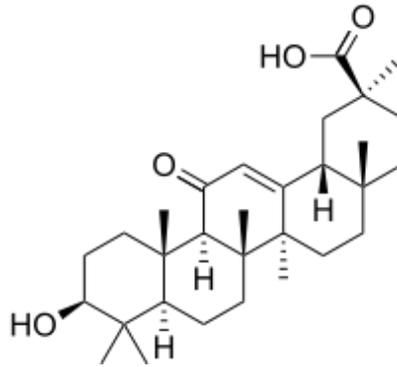


Figura 3. Fórmula estrutural da molécula de glicirrizina.

As enzimas são bem conhecidas como biocatalizadores verdes e tecnologia sustentável com alto grau de especificidade, seletividade e eficiência, o que lhes permite discriminar substratos, moléculas e isômeros ópticos. Infelizmente, a aplicação de enzimas livres é relativamente dispendiosa, quimicamente ou termicamente instável e difícil de manusear, purificar e reutilizar. Já na imobilização enzimática, a limitação é que as enzimas frequentemente mostram menor atividade enzimática em comparação com a enzima livre, mas são mais estáveis, reutilizáveis e mais facilmente separadas do produto. A imobilização covalente da enzima é uma técnica que atribui maior estabilidade da interação entre a enzima e o suporte, em comparação com outras técnicas (por exemplo, adsorção, aprisionamento, encapsulação e reticulação). A imobilização covalente requer um agente de acoplamento químico entre os grupos funcionais reativos da molécula de enzima e aqueles da superfície do suporte. Infelizmente, ao mesmo tempo, as ligações covalentes podem diminuir a atividade da enzima, porque alguns de seus sítios ativos podem ser modificados por meio da reação de acoplamento químico, uma vez que a maioria dos reagentes é agressiva e altamente reativa (SULAIMAN et al., 2017).

A imobilização de enzimas para a produção de açúcares, aminoácidos e drogas já vem sendo utilizada há mais de três décadas (SHULER e KARGI, 2002). Os processos de imobilização de enzimas possuem inúmeras vantagens quando comparados com a utilização de enzimas livres, como uso repetido e prolongado das enzimas imobilizadas, facilidade de separação das enzimas do meio reacional e processo de produção contínua em reatores simples (KAREL et al., 1985; MORIWAKI et al., 2007).

Os suportes principais disponíveis para a imobilização de proteínas incluem agarose, celulose e dextranas, polímeros tais como o cloreto de polivinila, acrilatos, nylons e poliestireno e, também, a sílica na forma de gel ou esferas de vidro (KRAGL et al., 1999).

Uma matriz ideal para imobilização deve ser forte, resistente às condições de operação e preferencialmente ter uma estrutura aberta, bem como barata. A esponja vegetal é um derivado de planta, composto principalmente por fibras de celulose, de baixo custo, facilmente disponível e, além disso, renovável. Esta matriz é livre de materiais tóxicos, tem aplicação e técnica de operação simples e uma alta estabilidade durante um longo prazo de uso repetido (IQBAL et al., 2005). A curdlana é um polímero de glicose de massa molecular elevada, trata-se de uma β -1,3-glucana produzida por cepas não patogênicas de *Agrobacterium* sp. e, recentemente, foi aprovada para uso alimentar pelo FDA (EUA). A sua massa molecular elevada e grande número de grupos hidroxila livres, disponíveis para ativação e ligação com outras moléculas, sugere que a curdlana seja adequada para a imobilização de enzimas (SAUDAGAR e SINGHAL, 2004).

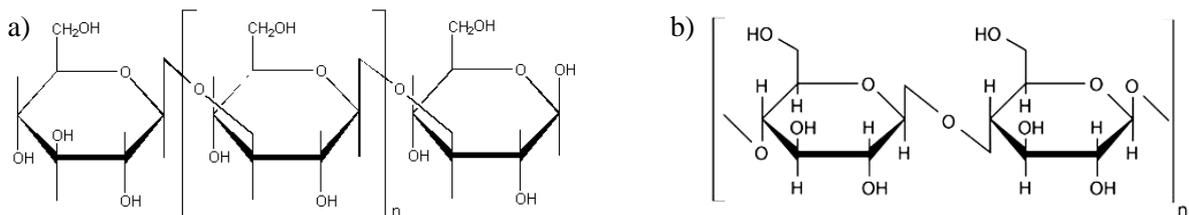


Figura 4. Fórmulas estruturais das moléculas que compõem os suportes naturais utilizados: a) curdlana; b) celulose (componente principal das fibras da esponja vegetal).

Algumas vezes, a imobilização de enzimas acarreta em diminuição de sua atividade ou mesmo inativação das espécies, que pode ser causada por interação com o suporte, agregação de proteínas ou limitações de transferência de massa, levando a uma baixa eficiência dos biocatalisadores imobilizados. Normalmente, a inativação está relacionada com alterações na conformação da proteína (DELFINO et al., 2013).

Considerando a importância das CDs e suas inúmeras aplicações industriais, a presente pesquisa teve por objetivo aprimorar a produção destas moléculas a partir de CGTase de *Bacillus firmus* cepa 37, utilizando diferentes tecnologias. Foram empregados sistemas de ultrafiltração nos modelos contínuo e, também, em bateladas repetitivas, para separação prévia das CDs e recuperação da enzima. O modelo de bateladas repetitivas em sistema de ultrafiltração também foi utilizado para a produção de CDs na presença do agente

complexante glicirrizina, para modular a atividade da CGTase e aumentar o rendimento de γ -CD. Além disso, a CGTase do *Bacillus firmus* cepa 37 foi imobilizada em curdlana e em esponja vegetal, e sua atuação na produção de CDs foi comparada ao desempenho da enzima livre. A Figura 5 aponta, de forma concisa, as diferentes estratégias adotadas para a produção de CDs. O presente estudo traz novas perspectivas para a produção de CDs e pode resultar em avanços significativos rumo à produção industrial das CDs no Brasil.

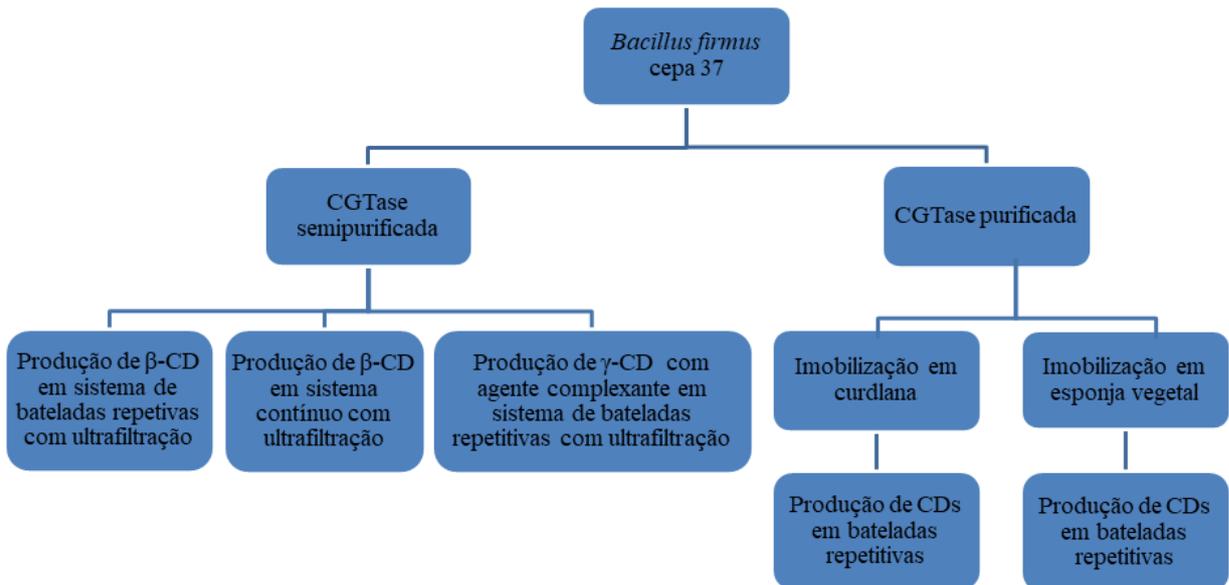


Figura 5. Diagrama das estratégias adotadas para a produção de CDs.

REFERÊNCIAS

- ALVES-PRADO, H. F.; CARNEIRO, A. A.; PAVEZZI, F. C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; FRANCO, C. M.; DA SILVA, R. Production of cyclodextrins by CGTase from *Bacillus clausii* using different starches as substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.146, p. 3–13, 2008.
- ARYA, S. K.; SRIVASTAVA, S. K. Kinetics of immobilized cyclodextrin gluconotransferase produced by *Bacillus macerans* ATCC 8244. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.507-510, 2006.
- ASTRAY, G.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; MEJUTO, J.C.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloid**, v. 23, p. 1631-1640, 2009.
- BENDER, H. Production, characterization, and application of cyclodextrins. **Advances in Biotechnological Processes**. v. 6, p. 31-71, 1986.
- BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p.645-666, 2007.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/>, 2018.
- CALSAVARA, L. P. V.; CUNHA, A. R. D.; BALBINO, T. A.; ZANIN, G. M.; MORAES, F.F. Production of cyclodextrins from cornstarch granules in a sequential batch mode and in the presence of ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, p. 1485-1493, 2011.
- CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 302-317, 2017.
- DELFINO, I.; PORTACCIO, M.; DELLA VENTURA, B.; MITA, D.G.; LEPORE, M. Enzyme distribution and secondary structure of sol–gel immobilized glucose oxidase by micro-attenuated total reflection FT-IR spectroscopy. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 304–310, 2013.
- DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1033-1046, 2004.
- DESOUZA, M.; FARIA, S. H. B.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Kinetics of cyclization reaction catalysed by the enzyme cyclomaltodextrin glucanotransferase. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 1111-1116, 2013.
- GASTÓN, J. A. R.; SZERMAN, N.; COSTA, H.; KRYMKIEWICZ, N.; FERRAROTTI, S. A. Cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R: Activity and kinetic studies. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 36–41, 2009.

GAWANDE, B.; PATKAR, A. Alpha-cyclodextrin production using cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumonia* AS-22. **Starch**, v. 53, p. 75-83, 2001.

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

GUO, J.; LIN, Y.; XIAO, Y.; CROMMEN, J.; JIANG, Z. Recent developments in cyclodextrin functionalized monolithic columns for the enantioseparation of chiral drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 130, p. 110-125, 2016.

IQBAL, M.; SAEED, A.; EDYVEAN, R. G. J.; O'SULLIVAN, B.; STYRING, P. Production of fungal biomass immobilized loofa sponge (FBILS)-discs for the removal of heavy metal ions and chlorinated compounds from aqueous solution. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 1319-1323, 2005.

KAREL, S. F.; LIBICKI, S. B.; ROBERTSON, C. R. The immobilization of whole cells: engineering principles. **Chemical Engineering Science**, v. 40, p. 1321-1354, 1985.

KIM, T. J.; LEE, Y. D.; KIM, H. S. Enzymatic production of cyclodextrins from milled corn starch in an ultrafiltration membrane bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 88-94, 1993.

KRAGL, U.; GREINER, L.; WANDREY, C. Enzymes, immobilized, reactors. In: M. C. FLICKINGER, & S. W. DREW (Eds.). **Encyclopedia of bioprocess technology: Fermentation, biocatalysis and bioseparation**. Vol. 2. New York: Wiley, 1999. p. 1064-1074.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, p.167-180, 2013.

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

LUO, M.; HUA, Y.; LIANG, Y.; HAN, J.; LIU, D.; ZHAO, W.; WANG, P. Synthesis of novel β -cyclodextrin functionalized S, N codoped carbon dots for selective detection of testosterone. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 98, p. 195-201, 2017.

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

MATIOLI, G.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enhancement of selectivity for producing γ -cyclodextrin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 84-86, p. 955-962, 2000.

MATIOLI, G.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* strain n° 37. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 643-654, 2001.

MATIOLI, G.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Influence of substrate and product concentrations on the production of cyclodextrins by CGTase of *Bacillus firmus*, strain n° 37. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 947-961, 2002.

MELO, N. F. S.; GRILLO, R.; MORAES, C. M.; BRITO, C. L.; TROSSINI, G. H. G.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 35-44, 2007.

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

PINTO, F. S.; FLÔRES, S. H.; AYUB, M. A.; HERTZ, P. F. Production of cyclodextrin glycosyltransferase by *alkaliphilic Bacillus circulans* in submerged and solid-state cultivation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, p. 377-382, 2007.

SAUDAGAR, P. S.; SINGHAL, R. S. Curdlan as a support matrix for immobilization of enzyme. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 483-488, 2004.

SHULER, M. L.; KARGI, F. Enzymes. In: **Bioprocess engineering basic concepts**. 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. p. 57-104.

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

SCHWARZ, D. H.; ENGELKE, A.; WENZ, G. Solubilizing steroidal drugs by β -cyclodextrin derivatives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, p. 559-567, 2017.

SULAIMAN, S.; CIEH, N. L.; MOKHTAR, M. N.; NAIM, M. N.; KAMAL, S. M. M. Covalent immobilization of cyclodextrin glucanotransferase on kenaf cellulose nanofiber and its application in ultrafiltration membrane system. **Process Biochemistry**, v. 55, p. 85-95, 2017.

SUVARNA, V.; GUJAR, P.; MURAHARI, M. Complexation of phytochemicals with cyclodextrin derivatives – An insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1122-1144, 2017.

SZEJTLI, J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. **Journal of Materials Chemistry**, v.7, n. 4, p. 575-587, 1997.

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

SZERMAN, N.; SCHROH, I.; ROSSI, A. L.; ROSSO, A. M.; KRYMKIEWICZ, N.; FERRAROTTI, S. A. Cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2886-2891, 2007.

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

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

VAN DER VEEN, B. A.; UITDEHAAG, J. C. M.; DIJKSTRA, B. W.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 336-360, 2000.

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

VARAN, G.; VARAN, C.; ERDOGAR, N.; HINCAL, A. A.; BILENSOY, E. Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, p. 457-469, 2017.

VETTER, D.; THORN, W. Directed enzymatic synthesis of linear and branched glucooligosaccharides, using cyclodextrin-glucanosyltransferase. **Carbohydrate Research**, v. 223, p. 61-69, 1992.

WANG, L.; WU, D.; CHEN, J.; WU, J. Enhanced production of γ -cyclodextrin by optimization of reaction of γ -cyclodextrin glycosyltransferase as well as synchronous use of isoamylase. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3072-3076, 2013.

WANG, Z.; QI, Q.; WANG, P. G. Engineering of cyclodextrin glucanotransferase on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* for improved cyclodextrin production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 1873-1877, 2006.

ZHEKOVA, B. Y.; PISHTIYSKI, I. G.; STANCHEV, V. S. Investigation on cyclodextrin production with cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 328-334, 2008.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Diferentes Estratégias para a Obtenção de Ciclodextrinas: Sistemas de Ultrafiltração, Imobilização da CGTase e Uso de Agente Complexante

Vanderson Carvalho Fenelon^a, Juliana Harumi Miyoshi^a, Camila Sampaio Mangolim^a, Aline Satomi Noce^a, Luciana Numata Koga^a, Graciette Matioli^{a, *}

^a Laboratório de Biotecnologia Enzimática, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil

* Autor para correspondência: Departamento de Farmácia (DFA), Universidade Estadual de Maringá (UEM), Av. Colombo, 5790, Jardim Universitário, CEP: 87020-900, Maringá, PR, Brasil. Endereço de e-mail: gmatioli@uem.br (G. Matioli).

Resumo

Avaliou-se comparativamente diferentes modelos estratégicos de produção de ciclodextrinas (CDs) a partir da CGTase de *Bacillus firmus* cepa 37: produção contínua e bateladas repetitivas em sistemas de ultrafiltração; imobilização da CGTase nos suportes naturais curdlana e esponja vegetal; e a utilização do agente complexante glicirrizina para modular a seletividade da CGTase em favor da produção de γ -CD. Todas as estratégias tiveram em comum a possibilidade de separação da CGTase dos seus produtos inibitórios e a sua reutilização. No modelo de produção contínua, em 48 h de ensaio, as maiores produtividade e seletividade para β -CD foram obtidas, 1,47 mmol/L/h e 92,84%, respectivamente. A glicirrizina foi capaz de modular a produção da γ -CD com seletividade de 61,21% para bateladas de 30 h. A avaliação comparativa dos diferentes modelos estratégicos para obtenção de CDs mostrou particularidades que devem ser consideradas, e a maioria dos modelos estudados proporcionou rendimentos satisfatórios, bem como excelentes seletividades.

Palavras-chave:

Ciclomaltodextrina glucanotransferase
Bacillus firmus
Produção contínua
Batelada repetitiva
Glicirrizina
Suportes naturais

Abreviações:

CDs	Ciclodextrinas
α -CD	Alfa-ciclodextrina
β -CD	Beta-ciclodextrina
γ -CD	Gama-ciclodextrina
CGTase	Ciclomaltodextrina glucanotransferase
NMWL	Limite nominal de massa molecular

1. Introdução

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos obtidos a partir do amido por meio de uma reação de transglicosilação molecular catalisada pela enzima ciclomaltodextrina glucanotransferase (CGTase). As principais CDs são denominadas α -, β - e γ -CD e possuem, respectivamente, 6, 7 e 8 unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4. As propriedades físico-químicas das CDs as tornam capazes de formar complexos de inclusão com diversas outras moléculas, proporcionando, por exemplo, melhor solubilidade e estabilidade, bem como gerando uma série de aplicações tecnológicas e industriais (Del Valle, 2004; Van Der Veen, Uitdehaag, Dijkstra, & Dijkhuizen, 2000).

As CDs foram isoladas pela primeira vez em 1891, mas a elucidação de sua estrutura, o estudo das propriedades de formação de complexo, a preparação de derivados e a caracterização de CGTases são conhecimentos que só se desenvolveram em meados da década de 30 e início da década de 70 (Szejtli, 1988). A partir da década de 70, as CDs começaram a ser utilizadas nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, químicas e outras, o que foi impulsionado pelo grande número de artigos e patentes na área, por estudos toxicológicos confiáveis e pela produção da β -CD em escala industrial (Szejtli, 1987).

A atividade ciclizante da CGTase pode ser inibida na presença de altas concentrações de produto, o que acarreta uma queda na produção de CDs, conforme a sua concentração no meio reacional aumenta. Assim, na produção de CDs em batelada, quando a mistura reacional está próxima do seu equilíbrio final, a CGTase torna-se insensível a variações na concentração do substrato. A possibilidade de concentrações maiores de enzima apenas faria com que o equilíbrio se estabelecesse mais rapidamente. Portanto, uma alternativa para melhorar o rendimento das CDs é a remoção de seus produtos inibitórios acumulados na mistura reacional, o que pode ser obtido pelo emprego de um sistema de ultrafiltração acoplado ao reator que contém o meio reacional. Sistemas de ultrafiltração, sejam eles convencionais ou tangenciais, permitem a utilização de diferentes estratégias de produção,

como o modelo de bateladas repetitivas ou a produção contínua (Fenelon, Aguiar, Miyoshi, Martinez, & Matioli, 2015; Gastón, Costa, & Ferrarotti, 2015; Gastón, Szerman, Costa, Krymkiewicz, & Ferrarotti, 2009; Gawande & Patkar, 2001; Kim, Lee, & Kim, 1993, Slominska, Szostek, & Grzeskowiak, 2002).

A imobilização da CGTase também é uma ferramenta importante, que apresenta inúmeras vantagens em potencial quando comparada com a sua utilização na forma livre, como uso repetido e prolongado das enzimas imobilizadas, facilidade de separação das enzimas do meio reacional e processo de produção contínua em reatores simples (Shuler & Kargi, 2002; Schöffner, Klein, Rodrigues, & Hertz, 2013; Schöffner et al., 2017). Suportes naturais têm sido cada vez mais propendidos para utilização nos processos de imobilização. A esponja vegetal é um derivado de planta, de baixo custo, facilmente disponível e, além disso, renovável. Esta matriz é livre de materiais tóxicos, tem aplicação e técnica de operação simples e uma alta estabilidade durante um longo prazo de uso repetido (Iqbal, Saeed, Edyvean, O'sullivan, & Styring, 2005). Outra possibilidade de suporte é a curdlana, polímero de glicose de massa molecular elevada, ou seja, uma β -1,3-glucana produzida por cepas não patogênicas de *Agrobacterium* sp. e, recentemente, aprovada para uso alimentar pelo FDA (EUA). A sua massa molecular elevada e grande número de grupos hidroxila livres, disponíveis para ativação e ligação com outras moléculas, sugere que a curdlana seja adequada para a imobilização de enzimas (Saudagar & Singhal, 2004).

A elevada solubilidade da γ -CD facilita a preparação de soluções mais concentradas de moléculas ativas. Entretanto, α - e β -CD são mais frequentemente produzidas em escala industrial, devido à baixa produção de γ -CD por CGTases microbianas (Wang, Wu, Chen, & Wu, 2013). Uma das maneiras de alcançar melhor rendimento da γ -CD é impedir a sua destruição por reações reversas que podem ocorrer durante a sua produção. Isto é possível por meio da formação de um complexo estável da γ -CD com um agente complexante apropriado, como a glicirrizina. Esta substância é natural, não tóxica e com elevado poder edulcorante. Além disso, complexa-se com a γ -CD com especificidade de 100% em relação às demais CDs (Matioli, Zanin, & Moraes, 2000; Sato, Nagano, Yagi, & Ishikura, 1985; Sato & Yagi, 1991).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente diferentes estratégias de produção de CDs, que têm em comum a possibilidade de separação da CGTase dos seus produtos inibitórios no meio reacional e, conseqüentemente, a sua reutilização e melhor aproveitamento. Para todos os ensaios, utilizou-se a CGTase do *Bacillus firmus* cepa 37 e o substrato amido de milho 5% (p/V) na presença de etanol 10% (V/V), nas condições

reacionais otimizadas em estudo anterior (Fenelon et al., 2015). Na primeira estratégia, foram utilizados dois diferentes sistemas de ultrafiltração para a produção de β -CD nas formas contínua e de bateladas repetitivas. O segundo conjunto de estratégias foi a imobilização da CGTase em dois suportes naturais, curdlana e esponja vegetal, e a avaliação da produção de CDs em bateladas repetitivas. A última estratégia adotada foi a utilização do agente complexante glicirrizina para modular a seletividade da CGTase em favor da γ -CD, aumentando o seu rendimento no modelo de bateladas repetitivas em sistema de ultrafiltração.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

As α -, β - e γ -CDs, utilizadas como padrão, e a glicirrizina (ácido glicirrízico, sal de amônio, G2137, lote 070M1636V), utilizada como agente complexante, foram adquiridas da Sigma (St. Louis, MO, EUA). O amido de milho, utilizado como substrato em todos os ensaios, era de grau alimentício (Maizena, Unilever Company) e foi comprado em um mercado local. A maltodextrina (dextrina 10 de amido de milho, artigo 31410), utilizada nas determinações de atividade enzimática, foi obtida da Fluka (Buchs, Suíça). A curdlana, utilizada como suporte de imobilização foi adquirida da Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan), e a esponja vegetal *in natura* foi obtida em um mercado local. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Enzima e meio reacional

A enzima CGTase utilizada em todos os ensaios foi obtida a partir do *B. firmus* cepa 37, isolado de solo de plantação de mandioca por Matioli, Zanin, Guimarães, & Moraes (1998).

Para as estratégias de imobilização, utilizou-se a CGTase purificada por cromatografia de afinidade bioespecífica, de acordo com a metodologia descrita por Moriwaki, Mazzer, Pazzetto, & Matioli (2009). Para todas as demais estratégias, utilizou-se a CGTase semipurificada pela metodologia estudada por Fenelon et al. (2015).

A atividade enzimática, o teor de proteínas e a atividade enzimática específica das amostras foram determinadas para padronizar a concentração de enzima em relação aos volumes de meio reacional para produção de CDs. Em todos os ensaios, a concentração

enzimática utilizada no meio reacional foi de 0,1 U/mL. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de CGTase que produz 1 μmol de $\beta\text{-CD}$ por minuto, sob as condições de teste.

A composição geral do meio reacional utilizado foi: substrato amido de milho 5% (p/V), etanol 10% (V/V), tampão Tris-HCl 50 mmol/L (pH 8,0) 20% (V/V), solução de CaCl_2 5 mmol/L 10% (V/V) e água purificada q.s.p. 100% (Fenelon et al., 2015). Todos os meios reacionais utilizados nos ensaios foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C, por 15 min.

2.3. Produção de CDs em bateladas repetitivas de 12 h em sistema de ultrafiltração

O sistema de ultrafiltração para produção de CDs em bateladas repetitivas foi previamente apresentado por Fenelon et al. (2015). Na ocasião, foram executadas 8 bateladas repetitivas e observou-se que as bateladas com duração de 12 h ofereciam vantagens para a produtividade e seletividade da $\beta\text{-CD}$. No entanto, no modelo previamente testado, o teor de amido não era ajustado a cada nova batelada, causando um crescente aumento na sua concentração e, conseqüentemente, na viscosidade do meio, com gradativa redução do fluxo de ultrafiltração após cada batelada. No presente estudo, o número de bateladas foi estendido e a concentração de substrato no meio reacional foi corrigida de acordo com a taxa de conversão do amido em CDs.

Utilizando a CGTase semipurificada do *B. firmus* cepa 37, na concentração enzimática de 0,1 U/mL de meio reacional, foi realizada a produção de CDs a partir do substrato amido de milho 5% (p/V) na presença de etanol 10% (p/V), pH 8,0, em um sistema de bateladas repetitivas com 12 h de duração. Entre as bateladas, o meio reacional foi ultrafiltrado para remoção das CDs e demais produtos inibitórios formados durante a reação. A CGTase foi recuperada e imediatamente reutilizada na batelada seguinte. O ensaio foi executado em reator de vidro encamisado com capacidade para 50 mL de meio reacional, que permaneceu sob agitação constante e temperatura de 50 °C.

Ao término da primeira batelada de 12 h, todo o volume de meio reacional foi transferido, com auxílio de bomba peristáltica, para dispositivo Amicon[®] (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), no qual passou por ultrafiltração em membrana de 10 kDa NMWL e 44,5 mm de diâmetro, por pressão de gás nitrogênio (30 a 40 Psi) e sob agitação. A CGTase do *B. firmus* cepa 37 possui massa molecular de aproximadamente 78000 Da (Matioli, Zanin,

& Moraes, 2001) e, dessa forma, foi retida pela membrana. Porém, α -, β - e γ -CD, que possuem 972, 1135 e 1297 Da, respectivamente, foram filtradas.

O filtrado foi recolhido e armazenado para determinação da concentração de CDs. Todo o volume retido (contendo a enzima) foi suspenso em pequena quantidade de tampão Tris-HCl 50 mmol/L e, com auxílio da bomba peristáltica, foi transferido novamente para o reator. Foram adicionados novos 50 mL de meio de produção, com a concentração de amido de milho corrigida de acordo com a taxa de conversão de 25% relatada por Fenelon et al. (2015). Sob as mesmas condições da primeira batelada, reações subsequentes de 12 h foram realizadas, com aplicação do procedimento de ultrafiltração no final das mesmas. As bateladas foram continuadas até que a CGTase perdesse consideravelmente a sua capacidade inicial de produção de CDs, para tanto, considerou-se uma redução de aproximadamente 50%. A Fig. 1 representa a estratégia de produção de CDs em bateladas repetitivas em sistema de ultrafiltração. Nesse modelo, uma única bomba peristáltica foi utilizada para transferência do meio reacional para o dispositivo de ultrafiltração e, em seguida, para retorno dos componentes não filtrados (enzima e substrato) para o reator, o qual foi realimentado com novo meio reacional para realização da batelada seguinte.

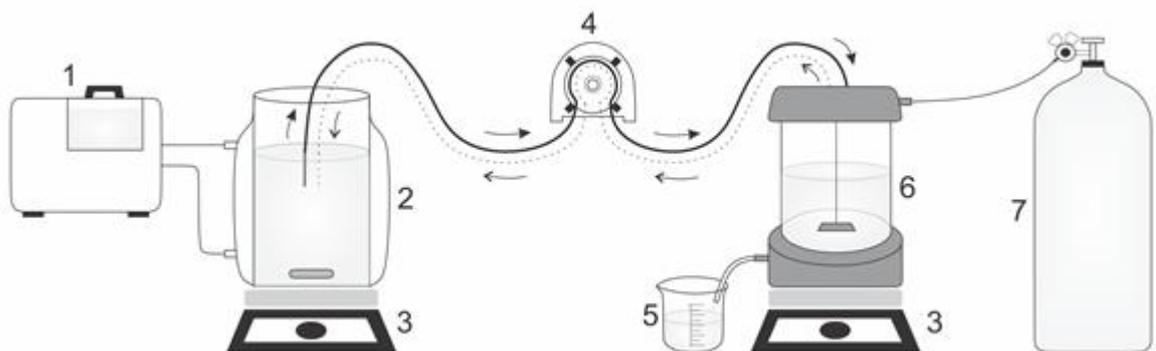


Fig. 1. Representação esquemática do sistema de ultrafiltração utilizado para a produção de CDs em bateladas repetitivas, contendo: banho termostatizado (1), reator encamisado (2), agitador magnético (3), bomba peristáltica (4), recipiente para coleta do ultrafiltrado (5), dispositivo de ultrafiltração Amicon® com membrana de 10 KDa NMWL (6) e cilindro de gás nitrogênio comprimido (7).

2.4. Produção de CDs em sistema contínuo de ultrafiltração

Utilizando os mesmos parâmetros reacionais descritos no item 2.3, a produção de CDs de forma contínua foi realizada em reator encamisado de vidro com capacidade para 500 mL de meio reacional, acoplado a um Módulo de Ultrafiltração (TE-0198, Tecnal, Piracicaba, Brasil) equipado com coluna de fibra oca com limite de exclusão de 50 kDa NMWL e área de membrana equivalente a 0,2 m². O reator também foi acoplado a um sistema de alimentação para reposição do substrato convertido. O volume de meio reacional no reator foi mantido em 500 mL, contudo, o volume total operacional foi de em 800 mL, pois 300 mL ficaram em circulação entre os condutos do sistema e a coluna. A produção foi continuada até que a CGTase perdesse consideravelmente a sua capacidade inicial de produção de CDs, para tanto, considerou-se uma redução de aproximadamente 50%. O modelo de produção contínua em sistema de ultrafiltração está representado na Fig. 2.

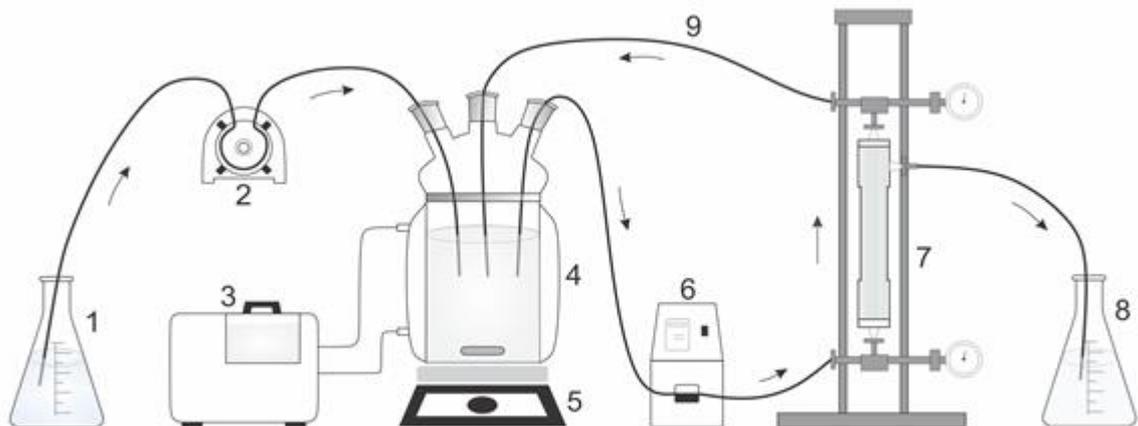


Fig. 2. Representação esquemática do sistema de ultrafiltração utilizado para a produção contínua de CDs, contendo: recipiente com meio reacional para alimentação do reator (1), bomba peristáltica para alimentação do reator (2), banho termostatizado (3), reator encamisado (4), agitador magnético (5), bomba peristáltica para transporte do meio para a coluna de ultrafiltração (6), coluna de ultrafiltração de fibra oca de 50 KDa NMWL (7), recipiente para coleta do ultrafiltrado (8), retorno dos componentes não filtrados (CGTase e substrato) para o reator (9).

A produção foi iniciada com um processo descontínuo (batelada) de 12 h para que houvesse o acúmulo inicial de CDs. Em seguida, o sistema de ultrafiltração foi colocado em funcionamento para início do processo de produção contínua. A potência da bomba foi fixada em 15%, resultando em um fluxo médio de permeado de 4,5 mL/min e pressão

transmembrana entre 10 e 15 Psi. Dessa forma, o fluxo de alimentação do reator com novo meio reacional também foi mantido em 4,5 mL/min para manutenção do volume reacional e concentração de substrato. Alíquotas do ultrafiltrado foram coletadas periodicamente para determinação cromatográfica da produção de CDs.

2.5. Imobilização da CGTase em curdlana e esponja vegetal para produção de CDs em bateladas repetitivas de 12 h

Para os ensaios de imobilização dois suportes naturais foram utilizados, a curdlana e a esponja vegetal (*Luffa Cylindrica*), que têm em comum o fato de serem formadas por cadeias poliméricas de glicose e, portanto, possuem número abundante de grupos hidroxila livres. Para imobilização da CGTase purificada, por ligação covalente aos suportes, utilizou-se uma adaptação da metodologia descrita por Saudagar & Singhal (2004).

Para a imobilização em curdlana, em 5 mL de NaOH 0,5 mmol/L foram dissolvidos 100 mg de curdlana e adicionou-se 1 mL de epícloridrina como molécula espaçadora para intermediar a ligação entre a CGTase e o suporte. A solução foi agitada durante 8 h à temperatura ambiente com um agitador magnético. A curdlana ativada com epóxi foi recuperada vertendo-se o gel em um banho contendo álcool etílico gelado. O precipitado epóxi-curdlana foi centrifugado a 4000 xg, durante 10 min e 8 °C. Em seguida, o precipitado foi lavado com água, recuperado por uma nova centrifugação e, então, utilizado como matriz para imobilização. À matriz de curdlana foi adicionado 1 mL de solução contendo a enzima purificada, juntamente com 5 mL de uma mistura de tampão Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8,0, e solução de CaCl₂ 5 mmol/L (na proporção de 60:40). A mistura foi agitada a 150 rpm, a 30 °C por 8 h. Após este período, o sobrenadante foi separado por centrifugação e a matriz lavada três vezes com a mesma mistura de soluções mencionada anteriormente. O sobrenadante e as soluções de lavagem foram analisados a fim de detectar atividade enzimática remanescente.

Uma vez alcançada a imobilização, deu-se início à sua utilização na produção de CDs em bateladas repetitivas, sob as mesmas condições reacionais utilizadas no ensaio de bateladas repetitivas com ultrafiltração, no entanto, ao término de cada batelada, o processo de ultrafiltração foi substituído por centrifugação do meio reacional por 10 min a 25 °C e 9000 xg. O precipitado contendo a CGTase imobilizada em curdlana e o substrato amido de milho remanescente foram utilizados para a batelada seguinte, empregando um novo meio

reacional com a concentração de amido corrigida. O sobrenadante foi armazenado e utilizado para determinação da concentração de CDs.

A imobilização em esponja vegetal iniciou com um tratamento prévio das esponjas, que consistiu em imersão em água fervente por 30 min, em seguida, lavagem com água corrente e imersão em água destilada por 24 h. Neste período, a água de imersão foi trocada três vezes. Então, as esponjas foram secas em estufa a 70 °C. Após o pré-tratamento, foram preparados discos de esponja vegetal com aproximadamente 8 mm de diâmetro e 15 mg cada disco. Um conjunto de discos foi pesado até totalizar uma massa de exatamente 100 mg. Foram adicionados aos discos 10 mL de NaOH 0,5 mmol/L e 1 mL de epicloridina e, em seguida, deixou-se em agitação por 8 h utilizando agitador magnético à temperatura ambiente. Os discos foram lavados em água purificada e mergulhados em uma solução contendo 7 mL da mistura Tris-HCl e CaCl₂ (60:40), citada anteriormente, juntamente com 1 mL da CGTase, e mantidos sob agitação a 100 rpm a 30 °C por 8 h. Após, os discos foram retirados da solução e lavados três vezes com solução Tris-HCl e CaCl₂ (60:40). A solução de imersão e as soluções de lavagem foram analisadas a fim de detectar atividade enzimática remanescente.

A CGTase imobilizada em esponja vegetal, foi utilizada para a produção de CDs em bateladas repetitivas, sob as mesmas condições reacionais utilizadas no ensaio de bateladas repetitivas com ultrafiltração. Assim como descrito para a CGTase imobilizada em curdlana, o meio reacional foi centrifugado a 25 °C e 9000 xg. O precipitado contendo o substrato remanescente e os discos de esponja com CGTase foram utilizados para a batelada seguinte, empregando um novo meio reacional com a concentração de amido corrigida. O sobrenadante foi armazenado e utilizado para determinação da concentração de CDs.

2.6. Produção de γ -CD na presença do agente complexante glicirrizina em bateladas repetitivas de 12 h e 30 h, intercaladas por ultrafiltração

A CGTase do *B. firmus* cepa 37, nas condições previamente estudadas, tem como produto majoritário o β -CD. Em proporção consideravelmente menor, é produzida o γ -CD. A presença de α -CD no meio reacional normalmente se limita a traços e, frequentemente, torna-se indetectável (Fenelon et al., 2015). Matioli et al. (2000) utilizaram a glicirrizina como agente complexante para o γ -CD e conseguiram um aumento expressivo da seletividade da CGTase de *B. firmus* cepa 37 para a produção dessa CD. Este presente estudo também objetivou direcionar a produção de CDs para um maior rendimento de γ -CD, utilizando o

agente complexante glicirrizina, contudo, o diferencial foi o emprego do modelo de bateladas repetitivas com ultrafiltração, que permite o uso continuado da enzima.

Para este ensaio, o mesmo sistema de ultrafiltração e os mesmos procedimentos descritos no item 2.3 foram utilizados. Ao meio reacional contendo amido de milho 5% (p/V) e etanol 10% (V/V) foram adicionados 2,5% (p/V) de glicirrizina, previamente solubilizada em água purificada alcalinizada até pH 8,0 com solução de NaOH 2 mmol/L.

Essa estratégia foi executada por meio de dois ensaios com diferentes durações das bateladas repetitivas: 12 h, levando em consideração a duração das bateladas recomendada por Fenelon et al. (2015), e 30 h, já que Matioli et al. (2000) demonstraram uma maior inversão entre as concentrações de β - e γ -CDs após 24 h de reação. Após a realização de 4 bateladas repetitivas na presença de glicirrizina, a quinta batelada foi realizada com meio reacional sem a presença do agente complexante, com a intenção de evidenciar o retorno da atividade da CGTase aos seus padrões normais de produção de CDs.

2.7 Métodos analíticos

2.7.1. Determinação da concentração de proteínas e da atividade enzimática da CGTase

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão. A atividade enzimática das amostras foi determinada de acordo com sua produção de β -CD, medida por método espectrofotométrico, conforme descrito por Moriwaki, Pelissari, Gonçalves, Gonçalves, & Matioli (2007).

2.7.2. Determinação cromatográfica de CDs

As concentrações de α -, β - e γ -CD foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Utilizou-se o cromatógrafo líquido Waters 2695 (Milford, MA, EUA) equipado com detector de índice de refração Waters 2414 (Milford, MA, EUA), coluna Microsorb-MV 100 NH₂ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). O desenvolvimento se deu por eluição isocrática, utilizando como fase móvel uma solução de acetonitrila e água (60:40) e um fluxo de 0,9 mL/min à temperatura ambiente (21 °C). A temperatura do detector foi ajustada para 30 °C. Os padrões e as amostras foram filtrados em membrana de 0,45 μ m. Curvas analíticas foram construídas para α -, β - e γ -CD, em diferentes faixas de concentração.

2.7.3. Determinação colorimétrica de CDs

Para os ensaios de produção de γ -CD na presença do complexante glicirrizina, as concentrações de β - e γ -CD foram determinados por métodos espectrofotométricos, uma vez que a glicirrizina mostrou-se incompatível com o método cromatográfico utilizado e com a coluna Microsorb-MV 100 NH₂ (Agilent Technologies). A glicirrizina parece interagir fortemente com a fase estacionária da coluna, permanecendo aprisionada. A coluna utilizada com amostras contendo glicirrizina passou a complexar toda γ -CD posteriormente injetada. Essa situação foi confirmada por meio de injeções de padrões contendo concentrações conhecidas de α -, β - e γ -CDs, nas quais não houve alteração na detecção de α - e β -CDs, mas a γ -CD se tornou indetectável (dados não mostrados). Essa importante incompatibilidade entre a glicirrizina e as colunas do tipo amino merece ser citada, uma vez que nenhum dado a esse respeito foi encontrado na literatura.

A β -CD foi determinada pelo método descrito por Tardioli, Zanin, & Moraes (2006), o qual baseia-se na descoloração de uma solução de fenolftaleína a 550 nm, que ocorre após complexação com a β -CD presente na amostra. Considerando que a relação entre a absorvância e a concentração de β -CD somente permanece linear para concentrações até 0,4 mmol/L, utilizou-se a teoria da complexação que fornece a relação não linear entre a absorvância e a concentração de β -CD. A γ -CD foi determinada pelo aumento da absorção a 620 nm de uma solução de verde de bromocresol após a complexação, conforme metodologia descrita por Kato & Horikoshi (1984). Os resultados de absorvância em função da concentração de γ -CD foram ajustados por regressão linear.

2.7.4. Análise estatística

Os resultados de rendimento de CDs, obtidos de três determinações de testes em triplicata, foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas por meio do teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

3. Resultados e discussão

3.1. Atividades das CGTases purificada e semipurificada

Para a CGTase purificada, a atividade enzimática determinada por método espectrofotométrico foi de 8,29 U/mL e, pelo método de Bradford (Bradford, 1976), o teor de

proteína foi de 0,08 mg/mL. Com esses dados foi calculada a atividade enzimática específica, que correspondeu a 103,63 U/mg. Para CGTase semipurificada, a atividade enzimática foi de 2,44 U/mL, o teor de proteína foi de 0,11 mg/mL e a atividade enzimática específica correspondeu a 22,18 U/mg.

3.1. Produção de CDs em bateladas repetitivas de 12 h, intercaladas por ultrafiltração

No ensaio de produção de CDs em bateladas repetitivas com duração de 12 h, foi possível a realização de 16 bateladas repetitivas, conforme Fig. 3. Na primeira batelada, a produção de β -CD alcançou 12,64 mmol/L, sendo que apenas uma pequena queda foi observada na segunda batelada (11,10 mmol/L). Nas demais bateladas, a produção de β -CD caiu progressivamente até atingir valores menores que 50% de sua capacidade inicial.

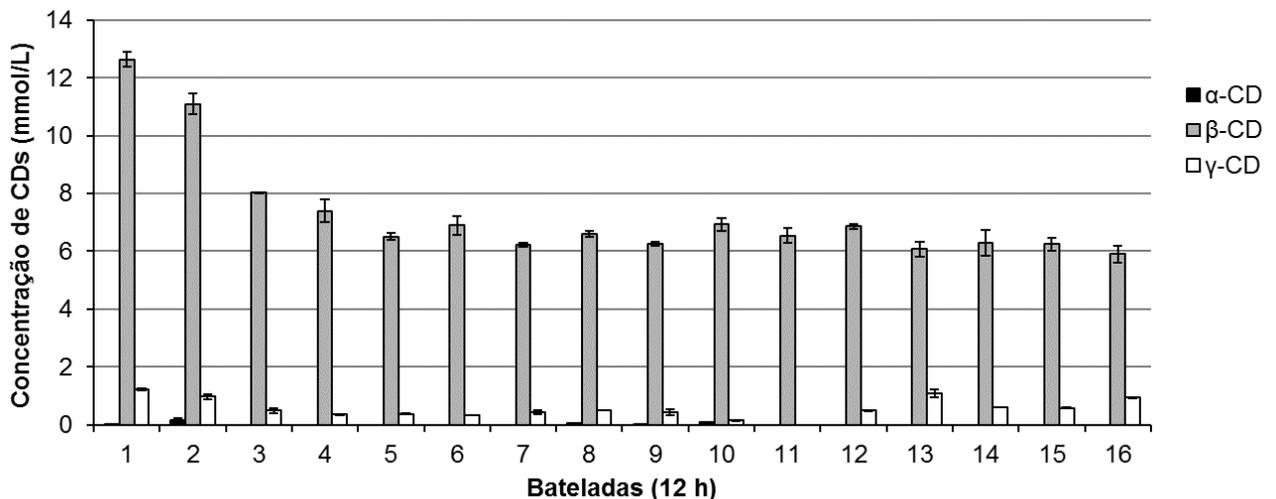


Fig. 3. Produção de CDs em 16 bateladas repetitivas de 12 h, utilizando CGTase semipurificada e substrato amido de milho 5% (p/V), na presença de etanol 10% (V/V), pH 8,0.

Em estudo prévio realizado por Fenelon et al. (2015), o processo de bateladas repetitivas em sistema de ultrafiltração foi utilizado sob condições operacionais similares, porém, sem a correção da concentração de substrato no meio reacional utilizado em cada batelada subsequente. Foram realizadas 8 bateladas, nas quais se observou uma produção satisfatória de β -CD, com queda tênue do rendimento entre as bateladas e alcançando produtividade de 0,72 mmol/L/h ao longo do processo. Os autores relataram que a taxa de conversão do substrato em CDs não foi considerada para correção do meio reacional e, assim,

a concentração crescente de amido a cada nova batelada tornava o meio cada vez mais viscoso, comprometendo a velocidade do fluxo de ultrafiltração.

Comparativamente, na presente pesquisa, as concentrações do meio reacional foram corrigidas a cada nova batelada de tal forma que o teor inicial de amido sempre estivesse próximo de 5% (p/V). Como esperado, este procedimento evitou o aumento da viscosidade do meio reacional e manteve a eficiência do fluxo de ultrafiltração. No entanto, a produtividade observada para as primeiras 8 bateladas do ensaio caiu ligeiramente para 0,68 mmol/L/h, ou seja, 5,55% menor do que a produtividade obtida no ensaio sem correção da concentração de amido. É possível inferir que as concentrações crescentes de substrato, quando a correção não é realizada, possam compensar a perda de atividade da CGTase relacionada à estabilidade operacional, pois, como é amplamente conhecido, o aumento da concentração de substrato, até certo ponto, leva ao aumento de rendimento do produto. No entanto, se um número maior de bateladas for considerado, é possível que o acúmulo de amido se eleve a patamares em que a viscosidade do meio dificulte o acesso da enzima ao substrato e, ao mesmo tempo, a alta concentração de amido iniba a atividade da enzima, como descrito por Schöffler et al. (2013).

Como pode ser observado na Fig. 3, o declínio da concentração de β -CD foi mais pronunciado nas bateladas iniciais, especialmente até a quinta batelada. Nas bateladas subsequentes, a produção de β -CD parece se estabilizar, resultando em concentrações muito semelhantes e com apenas uma diminuição lenta do rendimento ao longo das bateladas. É possível que este comportamento também esteja relacionado com o efeito do aumento da concentração de substrato no meio reacional, o que compensa até certo ponto a perda da estabilidade operacional da CGTase (conforme descrito no parágrafo anterior). Isso pode ocorrer porque, apesar da correção da concentração de amido em cada nova batelada, a taxa de conversão considerada para padronizar a correção do substrato nos ensaios (25%) não é mantida durante todo o ensaio. Em suma, a diminuição da taxa de conversão real, enquanto a mesma taxa padrão é utilizada para correção média, leva ao aumento gradual da concentração de amido no meio de reação ao longo do ensaio.

Quantidade pouco significativa de γ -CD foi produzida no decorrer das bateladas repetitivas, correspondendo a uma concentração média de 0,56 mmol/L. Para a maioria das bateladas, o α -CD não foi produzida em quantidade detectável. Sendo assim, uma excelente seletividade para β -CD foi obtida, alcançando 92,60% para a totalidade do ensaio.

3.2. Produção de CDs em sistema contínuo de ultrafiltração

A produção contínua foi mantida ao longo de 264 h (11 dias). A cada 12 h foram coletadas alíquotas do ultrafiltrado para determinação das CDs produzidas (Fig. 4). A produção de β -CD nas primeiras 12 h, sem ultrafiltração, foi de 16,90 mmol/L. Após a obtenção dessa batelada com rendimento satisfatório e acúmulo inicial de CDs, o sistema contínuo de ultrafiltração foi colocado em operação. Decorridas 12 h de processo contínuo, 24 h totais, apenas uma pequena queda na concentração β -CD foi observada, correspondendo a 16,61 mmol/L e, às 36 h de processo, a concentração ainda se manteve elevada (15,27 mmol/L). O rendimento de β -CD caiu de forma gradativa ao longo do ensaio. Após 264 h, a concentração de β -CD chegou a 5,85 mmol/L, quando se optou pela finalização do processo.

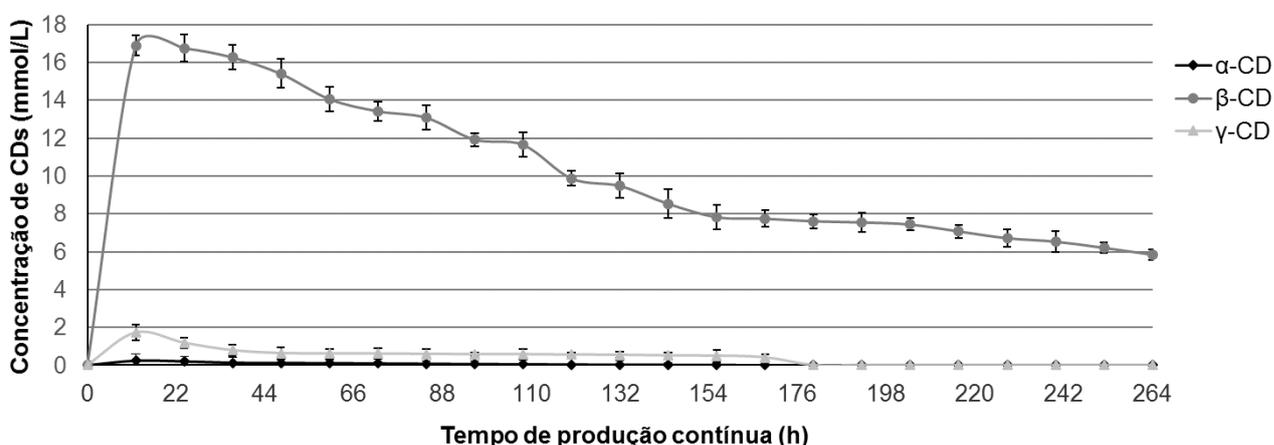


Fig. 4. Concentração de CDs ao longo de 264 h (11 dias) de produção contínua em sistema de ultrafiltração utilizando CGTase semipurificada e substrato amido de milho 5% (p/V), na presença de etanol 10% (V/V), pH 8,0.

A produção de α - e γ -CD foi bastante baixa ao longo de todo o período de produção. Após as primeiras 12 h de produção, as concentrações de α - e γ -CD foram 0,24 mmol/L e 1,74 mmol/L, respectivamente. Essa concentração caiu gradativamente e, a partir do tempo de 180 h, essas CDs deixaram de ser detectadas no meio reacional. Excelente seletividade para β -CD foi obtida ao longo do ensaio, com percentual médio de 95,39%. Assim, rendimentos satisfatórios de β -CD foram alcançados com o emprego do sistema contínuo de ultrafiltração, visto que inicialmente a produção manteve valores adequados e a queda no rendimento ocorreu lentamente, sem a necessidade de reposição da enzima ao longo do processo.

Esses resultados demonstram a efetividade do sistema contínuo de ultrafiltração para um melhor aproveitamento da CGTase na produção de CDs. A baixa produção observada

para α - e γ -CD já era esperada, pois a CGTase do *B. firmus* cepa 37, em condições normais, sem emprego de agentes complexantes, sempre produz uma proporção significativamente maior de β -CD em relação às demais, principalmente quando o substrato empregado é o amido de milho (Fenelon et al., 2015). Essa condição pode ser considerada bastante favorável, sobretudo quando se considera o aspecto de purificação para obtenção das CDs isoladas, o que é quase sempre desejável.

3.3. Imobilização da CGTase em curdlana e esponja vegetal para produção de CDs em bateladas repetitivas de 12 h

Após as imobilizações da CGTase em curdlana e esponja vegetal, foram realizadas determinações da atividade enzimática da CGTase e do teor de proteínas em todos os líquidos remanescentes dos processos, a fim de detectar a presença de enzima não ligada ao suporte. Verificou-se que a eficiência da imobilização da CGTase em curdlana correspondeu a 45% e em esponja vegetal foi de 30%, considerando a concentração de proteína imobilizada.

Para a produção de CDs, os volumes de meio reacional foram ajustados de modo a obter a concentração enzimática de 0,1 U/mL, conforme padronizado para todas as estratégias de produção de CDs. Para a enzima imobilizada em curdlana, foram realizadas 4 bateladas repetitivas. No final da primeira batelada, a concentração de β -CD no meio reacional foi satisfatória, alcançando 8,93 mmol/L (Fig. 5). Esse resultado demonstra que o processo de imobilização foi eficiente e que o método utilizado não afetou drasticamente o sítio ativo da CGTase e a sua habilidade de produzir CDs. No entanto, nas bateladas seguintes, embora a CGTase imobilizada em curdlana tenha continuado ativa, o rendimento de β -CD sofreu uma queda acentuada.

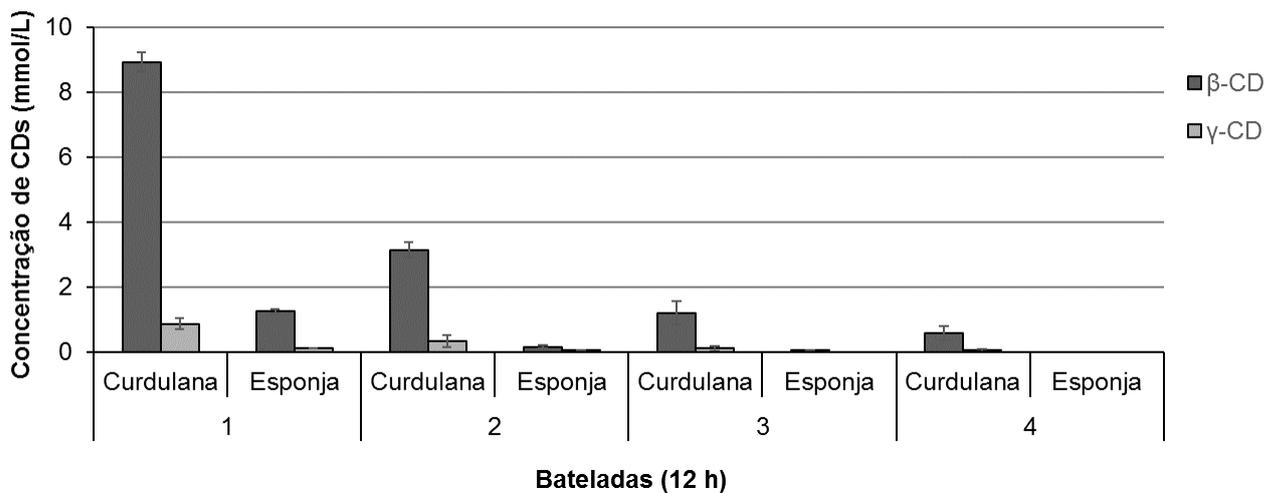


Fig. 5. Comparação da produção de CDs em 4 bateladas repetitivas de 12 h, utilizando CGTase purificada e imobilizada em 2 suportes diferentes: curdlana e esponja vegetal. O substrato foi amido de milho 5% (p/V), na presença de etanol 10% (V/V), pH 8,0.

Na primeira batelada de produção com a enzima livre em sistema de ultrafiltração (Fig. 3), a concentração de β -CD no meio reacional foi de 12,64 mmol/L, ou seja, cerca de 29% maior do que a produzida com a CGTase imobilizada. Este resultado evidencia a necessidade de aprimoramento do método de imobilização, embora a imobilização da CGTase em curdlana seja possível e produza rendimento aceitável de CDs.

A produção de β -CD pela CGTase imobilizada em esponja também foi executada em 4 bateladas repetitivas (Fig. 5). No final da primeira batelada de produção, a concentração de β -CD no meio reacional foi de 1,27 mmol/L, mostrando uma produção pouco satisfatória de β -CD, embora não tenha ocorrido inativação total da CGTase por esse método, o que é passível de advir caso o processo de imobilização afete o sítio ativo da enzima. Nas bateladas 2 e 3, a enzima permaneceu ativa produzindo uma pequena quantidade de β -CD, mas, na quarta batelada, já não foi possível detectar a presença de β -CD no meio reacional. Assim, mesmo que a quantidade de β -CD tenha sido bastante inferior à produzida pela enzima livre nas mesmas condições, a imobilização da enzima foi observada.

Tanto a CGTase imobilizada em curdlana quanto aquela imobilizada em esponja vegetal mantiveram sua característica de produção majoritária de β -CD, acompanhada de pequena quantidade de γ -CD, enquanto o α -CD não foi detectada em nenhuma das bateladas.

Um exemplo satisfatório de imobilização de CGTase é descrito por Schöffner et al. (2017a), em que uma CGTase comercial imobilizada em dois tipos de suporte de sílica

funcionalizada foi utilizada em um reator de leito fixo para produção contínua de CDs. Em seu resultado mais promissor, usando grupos amino por ativação com glutaraldeído, embora a taxa de imobilização tenha sido de apenas 2,86%, a CGTase manteve 100% de sua atividade inicial durante pelo menos 200 h.

3.4. Produção de γ -CD na presença do agente complexante glicirrizina em bateladas repetitivas de 12 h e 30 h, intercaladas por ultrafiltração

A efetividade da glicirrizina como agente complexante para aumentar a seletividade da γ -CD já foi evidenciada e comprovada em estudos anteriores (Matioli et al., 2000). No entanto, não há dados na literatura a respeito da utilização desse agente em um modelo de bateladas repetitivas em sistema de ultrafiltração com reutilização da CGTase. Neste estudo, a fim de evidenciar o efeito reversível da presença do agente complexante sobre a modulação da seletividade da CGTase, optou-se por proceder 4 bateladas na presença da glicirrizina e, em seguida, realizar a quinta batelada sem a sua adição ao meio reacional. O número de bateladas não foi estendido para que o efeito do agente complexante fosse observado enquanto a CGTase ainda estivesse com estabilidade operacional satisfatória.

O resultado dessa estratégia pode ser observado na Fig. 6. No ensaio com bateladas de 12 h, a concentração de β -CD ficou consideravelmente abaixo da que normalmente é obtida nas mesmas condições de ensaio, na ausência de glicirrizina, correspondendo a 6,11 mmol/L. Ao mesmo tempo, o rendimento de γ -CD está bastante aumentado, ou seja, 5,75 mmol/L, embora ainda não supere o de β -CD. As 3 bateladas seguintes mantiveram o mesmo comportamento, com pequenos decaimentos de concentração a cada batelada. Já no ensaio com bateladas de 30 h, foi possível observar a inversão dos rendimentos, ou seja, a concentração de γ -CD (7,91 mmol/L) superou a de β -CD (4,89 mmol/L) desde a primeira batelada. Esse comportamento se manteve até a quarta batelada, assim como ocorreu para as bateladas de 12 h.

Essa estratégia eficiente para aumentar a produção de γ -CD está em consonância com os esforços das pesquisas atuais, visando tecnologias mais promissoras para a obtenção industrial desta CD. Recentemente, Qiu et al. (2018) investigaram o efeito de vários solventes como agentes complexantes para a produção de γ -CD por uma γ -CGTase recombinante, por meio da reação de acoplamento a partir de β -CD e maltose. O melhor resultado foi obtido na presença de 5-ciclo-hexadecen-1-ona, atingindo 30,5% de rendimento de γ -CD.

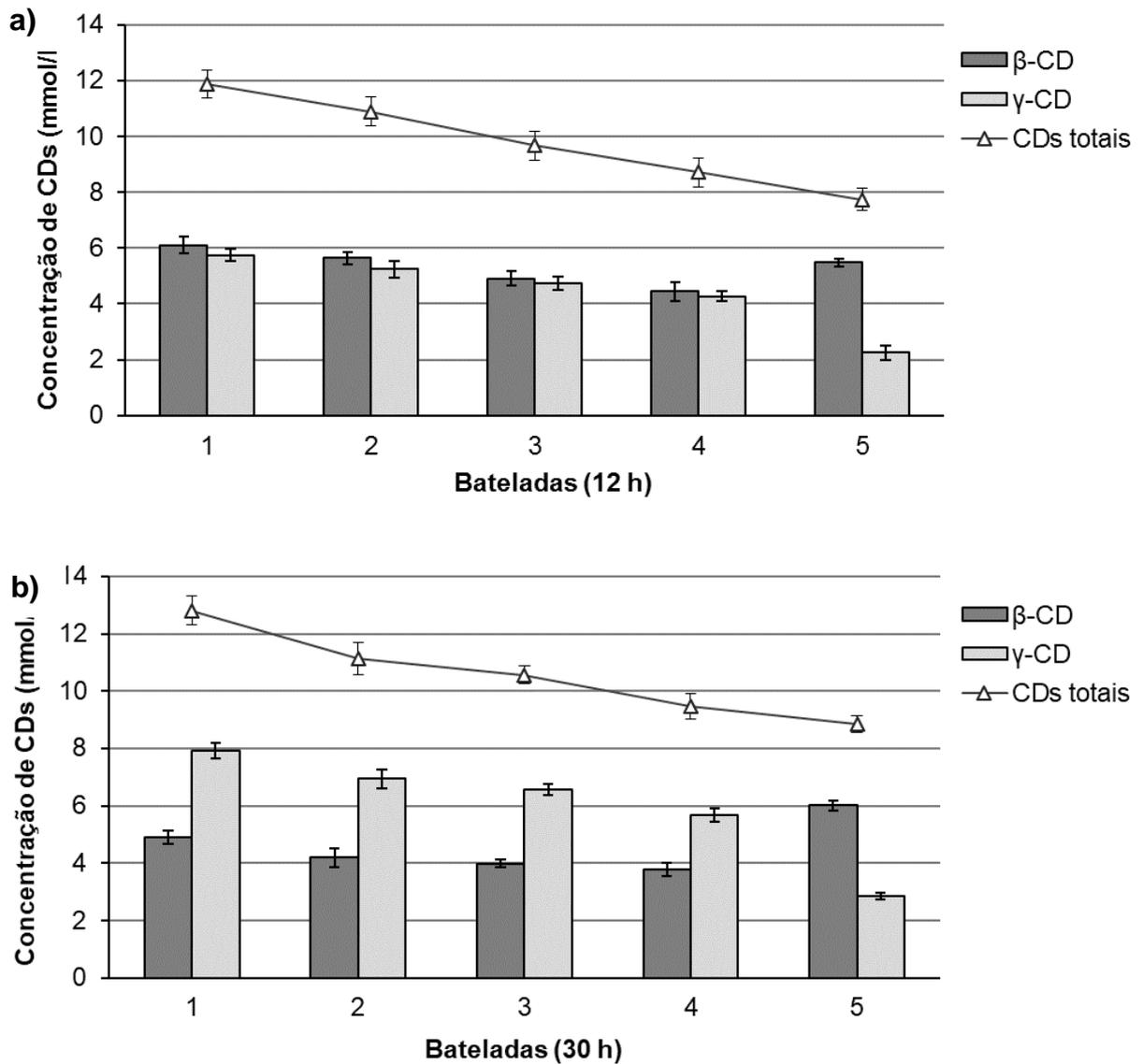


Fig. 6. Produção de CDs em 5 bateladas repetitivas de (a) 12 h e (b) 30 h. Em ambos os casos, as 4 primeiras bateladas foram conduzidas na presença de glicirrizina 2,5% (p/V) (agente complexante para γ -CD). Na quinta batelada, a glicirrizina foi suprimida do meio reacional. Utilizou-se CGTase semipurificada e substrato amido de milho 5% (p/V), na presença de etanol 10% (V/V), pH 8,0.

Na quinta batelada, com a supressão da glicirrizina, ocorreu a reversão do efeito causado pela presença do agente complexante, para ambos os ensaios, bateladas de 12 e 30 h. Este comportamento já era esperado, uma vez que o princípio da utilização de agentes complexantes não pressupõe modificação permanente na enzima. Em outras palavras, a modulação perdura enquanto houver complexante disponível no meio, apto a sequestrar o produto de interesse. No entanto, observa-se que essa reversão não foi total e que a concentração de γ -CD continua elevada em relação ao padrão da CGTase em estudo. O mais

provável é que este efeito esteja relacionado com a presença residual de glicirrizina no meio reacional utilizado na quinta batelada, já que para a sua eliminação total pela ultrafiltração seria necessária a realização de extensivas lavagens, o que foi evitado por se tratar de um procedimento pouco econômico.

Apesar da proporção entre β - e γ -CD ter sido amplamente modificada pela presença da glicirrizina, especialmente no ensaio com bateladas de 30 h, foi possível observar que o rendimento de CDs totais (soma das concentrações de β - e γ -CD) se manteve dentro da faixa comumente observada para a CGTase do *B. firmus* cepa 37.

3.5. Produtividade e seletividade comparativa entre as estratégias ensaiadas para produção de CDs

Para o estudo comparativo da produtividade e da seletividade entre as diferentes estratégias de produção de CDs foram consideradas, a princípio, as primeiras 48 h de ensaio e, para o cálculo da produtividade, somente o tempo de reação, pois o tempo gasto com a ultrafiltração ou outros procedimentos entre as bateladas não foram incluídos. Para alguns casos, 48 h de reação corresponderam à duração total do ensaio.

Na Fig. 7, é possível observar que a produtividade de CDs totais do modelo contínuo em sistema de ultrafiltração superou a produtividade de todas as demais estratégias, correspondendo a 1,47 mmol/L/h. Em seguida, a produtividade do modelo de bateladas repetitivas seguidas de ultrafiltração alcançou 0,88 mmol/L/h.

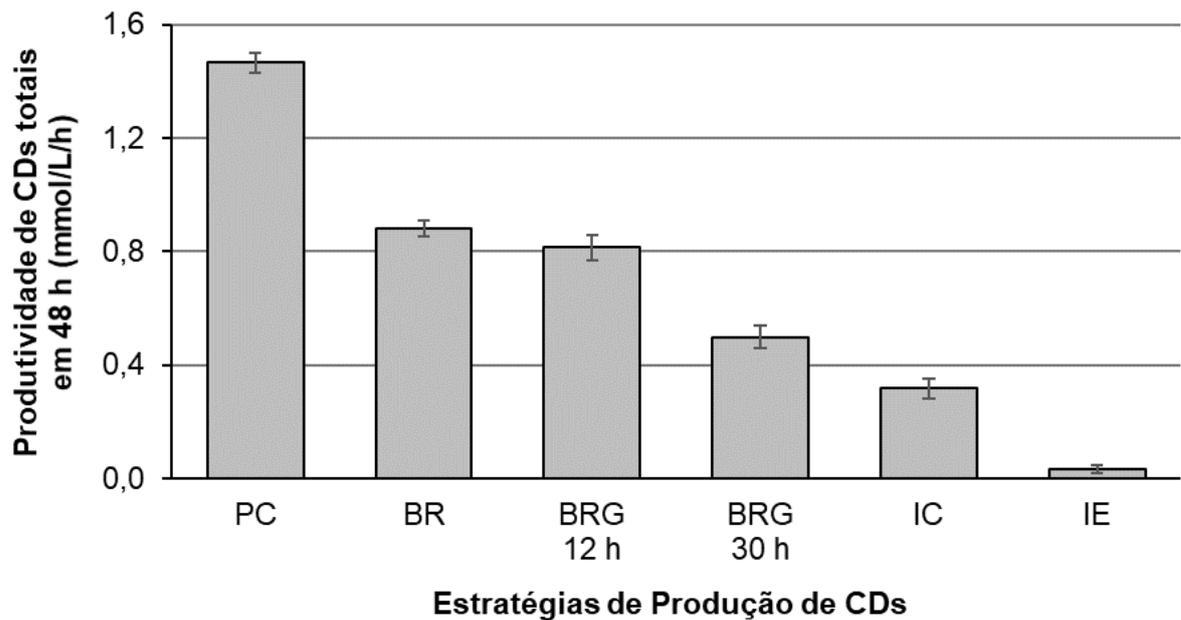


Fig. 7. Produtividade de CDs totais em 48 h de ensaio, determinada para cada estratégia: PC= produção contínua em sistema de ultrafiltração; BR= bateladas repetitivas em sistema de ultrafiltração; BRG 12 h= bateladas repetitivas de 12 h com glicirrizina, em sistema de ultrafiltração; BRG 30 h= bateladas repetitivas de 30 h com glicirrizina, em sistema de ultrafiltração; IC= bateladas repetitivas com a CGTase imobilizada em curdlana; IE= bateladas repetitivas com a CGTase imobilizada em esponja vegetal.

Essa grande diferença entre as produtividades, 40% maior para o processo contínuo, está relacionada, principalmente, com a maior eficiência deste modelo em evitar que o equilíbrio reacional seja alcançado, ou seja, que os produtos afetem a atividade da CGTase. Além disso, a produção contínua evita que a enzima permaneça ociosa durante o período de ultrafiltração, o que é inevitável no processo de bateladas repetitivas. Se o tempo de ultrafiltração após cada batelada repetitiva for considerado no cálculo da produtividade, observa-se que a superioridade do sistema contínuo se torna ainda mais ostensiva (quase 50% mais produtivo).

A menor produtividade de CDs totais observada para o ensaio de bateladas repetitivas de 30 h com glicirrizina (0,50 mmol/L/h) em relação à produtividade das bateladas de 12 h (0,81 mmol/L/h) está relacionada justamente com o tempo de duração das bateladas. Fenelon et al. (2015) demonstraram que as bateladas de maior duração apresentam menor produtividade devido ao estabelecimento do equilíbrio de produção de CDs. No entanto, para este ensaio específico, a maior duração da batelada levou a uma melhor atuação do agente

complexante e, conseqüentemente, uma melhor produção de γ -CD, conforme discutido no item 3.4.

As baixas produtividades observadas para as bateladas repetitivas com a CGTase imobilizada em curdlana (0,32 mmol/L/h) e em esponja vegetal (0,03 mmol/L/h) podem estar relacionadas com uma inativação parcial da enzima durante o processo de imobilização. Alguns dos motivos que podem explicar essa inativação são: a ocorrência de modificação do sítio ativo da enzima, perdendo sua especificidade e impossibilitando a ligação do substrato; o sítio ativo da enzima pode ter se ligado ao suporte ou, ainda, a desnaturação da enzima pela combinação dos solventes utilizados.

Como pode ser observado na Fig. 8, a seletividade da CGTase para a produção de β -CD alcançou percentuais elevados em todos os ensaios sem a presença do agente complexante glicirrizina. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que, em todos os ensaios, as CDs foram removidas do meio reacional antes que o equilíbrio de produção de β -CD fosse atingido. A alta seletividade já havia sido observada em estudo anterior quando a duração das bateladas é mantida em 12 h, ao mesmo tempo em que baixas seletividades foram observadas em ensaios com bateladas de 24 h, pois, uma vez atingido o equilíbrio de produção de β -CD, a CGTase ajusta sua produção na direção das α - e γ -CDs (Fenelon et al., 2015).

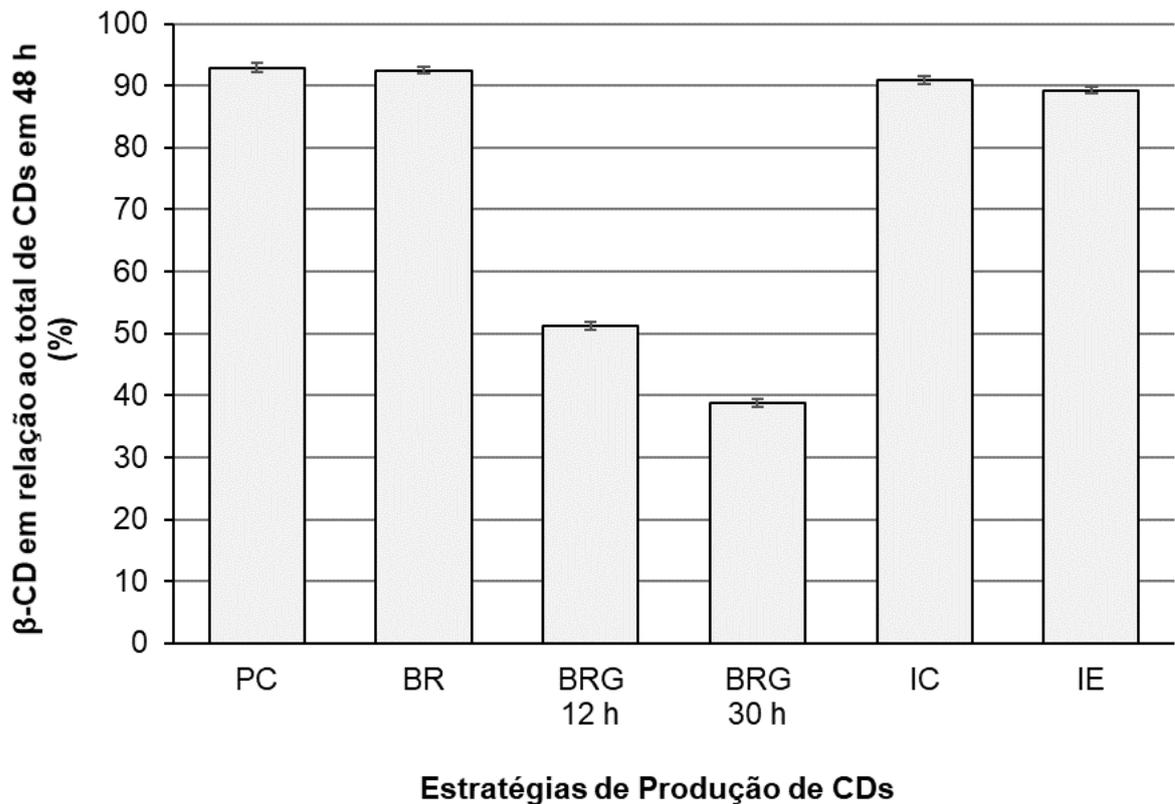


Fig. 8. Concentração de β -CD em relação ao total de CDs em 48 h de ensaio (seletividade), determinada para cada estratégia: PC= produção contínua em sistema de ultrafiltração; BR= bateladas repetitivas em sistema de ultrafiltração; BRG 12 h= bateladas repetitivas de 12 h com glicirrizina, em sistema de ultrafiltração; BRG 30 h= bateladas repetitivas de 30 h com glicirrizina, em sistema de ultrafiltração; IC= bateladas repetitivas com a CGTase imobilizada em curdlana; IE= bateladas repetitivas com a CGTase imobilizada em esponja vegetal.

No ensaio de produção contínua, 92,84% do rendimento foi relativo a β -CD nas primeiras 48 h, e 95,39% quando o período completo de produção (264 h) é considerado. Neste modelo, a excelente seletividade para β -CD também está relacionada com a sua eliminação do meio reacional antes que a concentração de equilíbrio seja alcançada, o que ocorre de forma ininterrupta e, portanto, ainda mais eficiente do que no modelo de bateladas repetitivas de 12 h.

É importante observar a acentuada queda na seletividade para β -CD que ocorreu nas bateladas repetitivas com a presença do agente complexante glicirrizina. No ensaio com bateladas de 12 h, a seletividade para β -CD caiu para 51,31%. No ensaio com bateladas de 30 h, a seletividade para β -CD correspondeu apenas a 38,79% e, portanto, uma seletividade de 61,21% para γ -CD, o que evidencia a efetividade da utilização da glicirrizina na modulação

da atividade da CGTase e aumento do rendimento de γ -CD no modelo de bateladas repetitivas em sistema de ultrafiltração.

Para uma melhor compreensão dos diferentes sistemas, a Tabela 1 resume alguns parâmetros calculados considerando as primeiras 48 h de cada uma das estratégias testadas. Vale ressaltar o excelente rendimento de CDs totais (40,2%) em relação à massa do substrato no meio reacional e a recuperação da atividade da CGTase após 48 h (85,6%), ambos obtidos no ensaio de produção contínua. Esses resultados estão de acordo com a produtividade expressiva alcançada com este modelo, discutido anteriormente. As menores percentagens de recuperação da atividade da CGTase para os modelos em batelada podem ser explicadas pelo tempo adicional em que a enzima permanece no processo de ultrafiltração após cada batelada (em média 2 h) e que possivelmente contribui para a perda de estabilidade.

Rakmai & Cheirsilp (2016) também obtiveram uma boa estabilidade operacional da CGTase para a produção contínua de β -CD, realizada por 96 h, em um reator contínuo de tanque agitado integrado com um reator de leito fixo, utilizando CGTase imobilizada em esferas mistas de alginato e gelatina. Durante as primeiras 60 h do processo, a produção de β -CD manteve-se relativamente estável entre 9,2 e 10,6 g/L, em 96 h a produção reduziu para 6,38 g/L.

A temperatura de trabalho ideal da CGTase de *B. firmus* cepa 37 é de 50 °C (Matioli et al., 2001), no entanto, a exposição a esta temperatura por longos períodos leva a uma degradação gradual e perda de atividade enzimática. Em um estudo recente, Zhang, Li e Zhang (2018) demonstraram a eficácia da adição de misturas químicas estabilizadoras para melhorar a termoestabilidade de uma CGTase recombinante, conseguindo um aumento de 7,6 e 9,4 vezes nas atividades enzimáticas para β - e γ -CD, respectivamente. Essa pode ser uma boa alternativa para tornar o aproveitamento da CGTase ainda mais satisfatório.

Tabela 1

Resumo de diferentes parâmetros calculados para cada estratégia empregada para produção de CDs, considerando as primeiras 48 h de teste.

Estratégia para produção de CDs	Produção média de CDs totais (mmol/L)	Rendimento de CDs totais (%) ^g	Recuperação da atividade da CGTase após 48 h (%)	Produtividade de CDs (mmol/L/h)			Relação entre as CDs/seletividade (%)		
				α -CD	β -CD	γ -CD	α -CD	β -CD	γ -CD
PC ^a	17,6 ± 0,4	40,2 ± 0,6	85,6 ± 0,7	0,015 ± 0,003	1,36 ± 0,04	0,09 ± 0,02	0,99 ± 0,04	92,8 ± 0,7	6,2 ± 0,2
BR ^b	10,6 ± 0,3	24,3 ± 0,5	61,3 ± 0,5	0,004 ± 0,001	0,83 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,82 ± 0,04	92,4 ± 0,5	6,8 ± 0,3
BRG 12 h ^c	9,8 ± 0,4	23,7 ± 0,5	64,2 ± 0,7	ND [*]	0,44 ± 0,04	0,37 ± 0,04	ND [*]	51,3 ± 0,6	48,7 ± 0,5
BRG 30 h ^d	4,2 ± 0,2	10,4 ± 0,3	66,2 ± 0,6	ND [*]	0,19 ± 0,04	0,31 ± 0,03	ND [*]	38,8 ± 0,7	61,2 ± 0,5
IC ^e	3,8 ± 0,2	8,8 ± 0,4	6,5 ± 0,3	ND [*]	0,29 ± 0,03	0,03 ± 0,01	ND [*]	90,9 ± 0,6	9,1 ± 0,2
IE ^f	0,42 ± 0,05	0,96 ± 0,04	ND [*]	ND [*]	0,03 ± 0,01	0,004 ± 0,002	ND [*]	89,3 ± 0,4	10,7 ± 0,4

^a PC = produção contínua em sistema de ultrafiltração; ^b BR = bateladas repetitivas em sistema de ultrafiltração; ^c BRG 12 h = bateladas repetitivas de 12 h, com glicirrizina, em sistema de ultrafiltração; ^d BRG 30 h = bateladas repetitivas de 30 h, com glicirrizina, em sistema de ultrafiltração; ^e IC = bateladas repetitivas com CGTase imobilizada em curdlana; ^f IE = bateladas repetitivas com CGTase imobilizada em esponja vegetal.

^g Relativo à massa de substrato no meio reacional.

*ND = não detectado.

Os resultados representam a média ± desvio padrão de três determinações de testes em triplicata.

4. Conclusão

Concluimos que cada uma das estratégias de produção de CDs utilizada possui particularidades, vantagens e desvantagens que devem ser consideradas de acordo com o objetivo almejado. A produção contínua em sistema de ultrafiltração merece ser destacada como uma estratégia que oferece elevada produtividade e seletividade para a produção de β -CD, nas condições testadas. As bateladas repetitivas em sistema de ultrafiltração, embora menos produtivas, tem o seu valor devido ao arranjo mais simples, com necessidade de menor número de equipamentos. O uso do agente complexante glicirrizina mostrou ser uma alternativa eficaz para aumentar a seletividade da γ -CD em modelos de bateladas repetitivas com ultrafiltração. Apesar da baixa produtividade e estabilidade da CGTase apresentadas quando as estratégias de imobilização foram avaliadas, a reutilização da enzima em bateladas repetitivas foi alcançada.

Cada um dos modelos estratégicos estudados nesta pesquisa possui condições ajustáveis e passíveis de otimização e, por meio de parâmetros de reação da CGTase do *B. firmus* cepa 37 previamente estudados, foi possível obter informações relevantes sobre o comportamento enzimático e como cada estratégia afeta o rendimento das CDs.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências brasileiras de fomento que contribuíram financeiramente para a realização desta pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária (FA).

Referências

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Del Valle, E. M. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39, 1033–1046.

- Fenelon, V. C., Aguiar, M. F. A., Miyoshi, J. H., Martinez, C. O., & Matioli, G. (2015). Ultrafiltration system for cyclodextrin production in repetitive batches by CGTase from *Bacillus firmus* strain 37. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38, 1291–1301.
- Gastón, J. A. R., Costa, H., & Ferrarotti, S. A. (2015). Continuous production of cyclodextrins in an ultrafiltration membrane reactor, catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. *Biotechnology Progress*, 31, 695–699.
- Gastón, J. A. R., Szerman, N., Costa, H., Krymkiewicz, N., & Ferrarotti, S. A. (2009). Cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R: Activity and kinetic studies. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 36–41.
- Gawande, B., & Patkar, A. (2001). Alpha-cyclodextrin production using cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumonia* AS-22. *Starch*, 53, 75–83.
- Iqbal, M., Saeed, A., Edyvean, R. G. J., O'sullivan, B., & Styring, P. (2005). Production of fungal biomass immobilized loofa sponge (FBILS)-discs for the removal of heavy metal ions and chlorinated compounds from aqueous solution. *Biotechnology Letters*, 27, 1319–1323.
- Kato, T., & Horikoshi, K. (1984). Colorimetric determination of γ -cyclodextrin. *Analytical Chemistry*, 56, 1738–1740.
- Kim, T. J., Lee, Y. D., & Kim, H. S. (1993). Enzymatic production of cyclodextrins from milled corn starch in an ultrafiltration membrane bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 41, 88–94.
- Matioli, G., Zanin, G. M., Guimarães, M. F., & Moraes, F. F. (1998). Production and purification of CGTase of alkalophilic *Bacillus* isolated from Brazilian soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70–72, 267–275.
- Matioli, G., Zanin, G. M., & Moraes, F. F. (2000). Enhancement of selectivity for producing γ -cyclodextrin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84–86, 955–962.
- Matioli, G., Zanin, G. M., & Moraes, F. F. (2001). Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* strain n° 37. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91–93, 643–654.

- Moriwaki, C., Mazzer, C., Pazzetto, R., & Matioli, G. (2009). Produção, purificação e aumento da performance de ciclodextrina glicosiltransferases para produção de ciclodextrinas. *Química Nova*, 32, 2360–2366.
- Moriwaki, C., Pelissari, F. M., Gonçalves, R. A. C., Gonçalves, J. E., & Matioli, G. (2007). Immobilization of *Bacillus firmus* strain 37 in inorganic matrix for cyclodextrin production. *Journal of Molecular Catalysis*, 49, 1–7.
- Qiu, C., Wang, J., Fan, H., Bai, Y., Tian, Y., Xu, X., & Jin, Z. (2018). High-efficiency production of γ -cyclodextrin using β -cyclodextrin as the donor raw material by cyclodextrin opening reactions using recombinant cyclodextrin glycosyltransferase. *Carbohydrate Polymers*, 182, 75–80.
- Rakmai, J., & Cheirsilp, B. (2016). Continuous production of β -cyclodextrin by cyclodextrin glycosyltransferase immobilized in mixed gel beads: Comparative study in continuous stirred tank reactor and packed bed reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 105, 107–113.
- Sato, M., Nagano, H., Yagi, Y., & Ishikura, T. (1985). *JPS60227693*. Japan.
- Sato, M., & Yagi, Y. (1991). Properties of CGTase from three types of *Bacillus* and production of cyclodextrins by the enzymes. In R.B. Friedman (Eds.), ACS Symposium Series, 458, *Biotechnology of Amylodextrin Oligosaccharides* (pp. 125–137). Washington, DC: American Chemical Society.
- Saudagar, P. S., & Singhal, R. S. (2004) Curdlan as a support matrix for immobilization of enzyme. *Carbohydrate Polymers*, 56, 483–488.
- Schöffner, J. d. N., Klein, M. P., Rodrigues, R. C., & Hertz, P. F. (2013). Continuous production of β -cyclodextrin from starch by highly stable cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 98, 1311–1316.
- Schöffner, J. d. N., Matte C. R., Charqueiro, D. S., de Menezes, E. W., Costa, T. M. H., Benvenuti, E. V., Rodrigues, R. C., & Hertz, P. F. (2017). Effects of immobilization, pH and reaction time in the modulation of α -, β - or γ -cyclodextrins production by cyclodextrin glycosyltransferase: Batch and continuous process. *Carbohydrate Polymers*, 169, 41–49.
- Schöffner, J. d. N., Matte C. R., Charqueiro, D. S., de Menezes, E. W., Costa, T. M. H., Benvenuti, E. V., Rodrigues, R. C., & Hertz, P. F. (2017a). Directed immobilization

- of CGTase: The effect of the enzyme orientation on the enzyme activity and its use in packed-bed reactor for continuous production of cyclodextrins. *Process Biochemistry*, 58, 120–127.
- Shuler, M. L., & Kargi, F. (2002). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. (2nd ed.). New Jersey: Prentice-Hall.
- Slominska, L., Szostek, A., & Grzeskowiak, A. (2002). Studies on enzymatic continuous production of cyclodextrins in an ultrafiltration membrane bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, 50, 423–428.
- Szejtli, J. (1987). Cyclodextrins and the molecular encapsulation. *Chimica oggi*, 3, 17–21.
- Szejtli, J. (1988). *Cyclodextrin Technology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Tardioli, P. W., Zanin, G. M., & Moraes, F. F. (2006). Characterization of *Thermoanaerobacter* cyclomaltodextrin glucanotransferase immobilized on glyoxilagarose. *Enzyme Microbial Technology*, 39, 1270–1278.
- Van Der Veen, B. A., Uitdehaag, J. C. M., Dijkstra, B. W., & Dijkhuizen, L. (2000). Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543, 336–360.
- Wang, L., Wu, D., Chen, J., & Wu, J. (2013). Enhanced production of γ -cyclodextrin by optimization of reaction of γ -cyclodextrin glycosyltransferase as well as synchronous use of isoamylase. *Food Chemistry*, 141, 3072–3076.
- Zhang, J., Li, M., & Zhang, Y. (2018). Enhancing the thermostability of recombinant cyclodextrin glucanotransferase via optimized stabilizer. *Process Biochemistry*, (in press).